

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**Optimización del muestreo de aguas empleando la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)**

Trabajo Especial de Grado  
presentado ante la ilustre Universidad  
Central de Venezuela, por la Br. Sikiu  
Corina La Riva Ruiz, para optar al  
título de Licenciada en Química  
opción Tecnología.

Caracas, Octubre de 2015

Nosotras, profesora Katya Reategui y profesora Raiza Fernández, investigadoras del Instituto de Ciencias de la Tierra de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“Optimización del muestreo de aguas empleando la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)”**

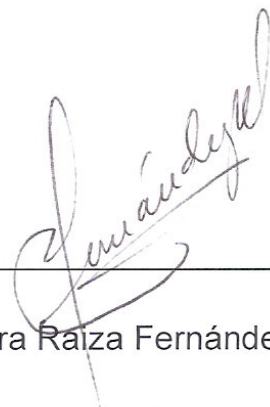
Que presenta la Br. Sikiu Corina La Riva Ruiz, para aspirar al título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Instituto de Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2014 y 2015, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre de 2015



Profesora Katya Reategui

(Tutor)



Profesora Raiza Fernández

(Tutor)


## ACTA

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“Optimización del muestreo de aguas empleando la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)”** presentado por la Br. Sikiu Corina La Riva Ruiz, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciada en Química.



Profesora Katya Reategui

(Tutor)



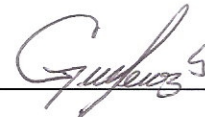
Profesora Raiza Fernández

(Tutor)



Profesora Rosa Amaro

(Jurado)



Profesor Gustavo Pérez

(Jurado)

## DEDICATORIA

*A mi madre, quien ha dedicado su vida para llevarme por el camino correcto, eres el pilar fundamental para que hoy en día este sueño se haga realidad, con tu apoyo sostenido e inagotable me has hecho ver que ningún obstáculo es demasiado grande y ningún sueño es inalcanzable.*

*Gracias a tí mamá, por no dejarme caer aún cuando todo parecía derrumbarse, sin tí jamás hubiese llegado hasta aquí. Te dedico este y todos los logros que están por venir. **TE AMO CON TODO MI CORAZÓN!!***

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios y la Virgen del Valle por darme las fuerzas y la energía necesaria para culminar esta meta tan importante en mi vida y ver hoy los resultados de tanto esfuerzo.

A la Universidad Central de Venezuela, en especial a la Facultad de Ciencias por abrirme sus puertas y permitir formarme como profesional, en esta magna casa de estudios que se convirtió en mi segundo hogar y en la que hoy hago realidad mi más grande sueño.

A mi madre bella, por estar siempre a mi lado, en esos momentos de angustia, noches sin dormir y que con tan sólo decir “ánimo hija que sí puedes” bastaba para levantarme y seguir adelante, eres el motor de mi vida, te amo infinitamente. Adriana, gracias por existir en nuestras vidas, gran parte de este logro también es tuyo, no encuentro palabras para agradecerte el apoyo incondicional que me has brindado, por estar ahí cuando más lo he necesitado y demostrarme que no se necesita llevar la misma sangre para llegar a ser una gran familia, te quiero mucho.

A mis abuelos, Gladys y Luis La Riva por su amor, comprensión y hacerme saber lo orgullosos que siempre han estado de mí. Al resto de mi familia, gracias por el apoyo y por aportar de alguna u otra manera un granito de arena en el transcurso de mi carrera.

Un especial y sincero agradecimiento a mis tutoras, profesora Katya Reategui y profesora Raiza Fernández, quienes además de guiarme en el ámbito académico me han brindado su amistad, valiosos consejos y palabras de aliento que en muchas oportunidades me levantaron el ánimo para culminar con éxito este proyecto, a ustedes mi respeto y admiración. Al profesor Roschman González, por su colaboración en la parte estadística de este trabajo, siempre estaré agradecida por su gran aporte.

De igual manera agradezco a mi jurado, profesora Rosa Amaro y profesor Gustavo Pérez, por la ayuda y atención prestada durante el desarrollo de este proyecto, gracias por sus consejos y recomendaciones.

Agradezco la importante y valiosa ayuda de las personas que laboran en el Instituto de Ciencias de la Tierra, profesores y personal técnico por facilitarme lo necesario para culminar mi tesis.

Estoy muy agradecida con mis compañeros de estudio, con quienes compartí grandes experiencias que serán inolvidables y quienes me brindaron su valioso apoyo a lo largo de este gran recorrido, y aunque tomamos caminos diferentes, siempre han estado allí: Daniela, Pinto, Adaney, Julio, Javier y Estefanía.

Finalmente, a todas las personas que de alguna u otra manera me han dado su apoyo pero por cuestiones de espacio no aparecen sus nombres..... A TODOS, MUCHAS GRACIAS!

## RESUMEN

En este estudio se desarrolló la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS), para optimizar el muestreo de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en aguas. Para ello, fue construido un dispositivo con materiales nacionales y utilizando aceite de soya como fase secuestrante, la extracción se llevó a cabo con ultrasonido; para la separación de la fracción aromática fue aplicada la cromatografía en columna y la determinación de los HAP se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). La solución acuosa fue preparada en el laboratorio, con una concentración de 5 mg/L en naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno. El diseño experimental abarcó un total de 12 muestras, evaluando dos factores: tiempo de exposición y agitación.

Los resultados del diseño experimental indicaron que la condición óptima de muestreo para el dispositivo confeccionado corresponde a un tiempo de 8 horas sin agitación. Un aspecto a resaltar corresponde a que se obtuvo valores de fracción de hidrocarburos aromáticos (F.H.A) de  $0,018 \pm 0,002$  g/mL de aceite. En los resultados del análisis cromatográfico se identificaron los HAP que fueron expuestos en la solución acuosa: naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno, los cuales fueron determinados mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de un patrón de 0,2975 mg/L de cada uno de los HAP evaluados. En conclusión, la técnica de DMS puede ser implementada en aguas de ríos donde se sospeche exista contaminación de estos HAP en un tiempo mínimo de muestreo de 8 horas, lo cual, representa una ventaja en la determinación de estos compuestos en agua sobre todo en las condiciones sociales actuales, lo que va a permitir determinar su presencia en ambientes naturales.

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	4
2.1.1 Propiedades físicas y químicas de los HAP.....	6
2.1.2 Formación de los HAP.....	8
2.1.3 Fuentes de emisión de los HAP.....	9
2.1.3.1 Otras fuentes menos comunes: el tabaco y los alimentos.....	11
2.1.4 Distribución de los HAP en el medio ambiente.....	12
2.1.4.1 HAP en el aire.....	12
2.1.4.2 HAP en el agua y suelo.....	13
2.1.5 Efectos de los HAP sobre la salud y el medio ambiente.....	14
2.2 MUESTREO PASIVO.....	16
2.2.1 Tipos de muestreadores pasivos.....	16
2.3 FUNDAMENTO TEÓRICO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	19

2.4 DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE.....	20
2.4.1 Ventajas y desventajas de los DMS.....	25
2.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN APLICADAS SOBRE DMS.....	27
2.5.1 Extracción asistida por ultrasonido.....	28
2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HAP.....	31
2.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS: Análisis de Varianza (ANOVA).....	33
2.8 ANTECEDENTES.....	34
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>42</b>
4.1 CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE (DMS).....	43
4.1.1 Relleno de la membrana semipermeable.....	43
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
4.2.1 Pruebas de solubilidad aplicadas a los patrones puros de HAP.....	47
4.2.2 Preparación de la solución de estudio.....	47
4.2.3 Exposición de las membranas semipermeables.....	49

4.2.4 Extracción asistida por ultrasonido del extracto orgánico.....	49
4.2.5 Separación de la fracción de hidrocarburos aromáticos.....	51
4.2.6 Determinación de los HAP por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	54
4.2.7 Tratamiento estadístico mediante el análisis de varianza (ANOVA) con dos factores.....	57
4.3 EXPOSICIÓN DEL DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE.....	57
<b>5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
5.1 CONFECCIÓN DEL DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE.....	59
5.1.1 Aceite de soya como fase secuestrante.....	64
5.2 ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE MUESTREO SEGÚN EL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	65
5.3 RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL POR ANÁLISIS DE VARIANZA CON DOS FACTORES.....	69
5.4 ANÁLISIS DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA DE MUESTREO EMPLEADA.....	73
5.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS HAP PRESENTES EN LAS FRACCIONES DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS.....	73
5.6 ANÁLISIS DE LA EXPOSICIÓN DEL DMS A LA CONDICIÓN ÓPTIMA DE MUESTREO.....	78
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>81</b>

<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
<b>9. APÉNDICE.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Propiedades físico-químicas para 16 HAP.....	7
<b>Tabla 2.</b> Comparación de las características de los muestreadores pasivos y sus aplicaciones para compuestos orgánicos.....	18
<b>Tabla 3.</b> Modelos de dispositivos de membrana semipermeable y canastas metálicas.....	24
<b>Tabla 4.</b> Pesos del aceite agregado a cada membrana semipermeable.....	45
<b>Tabla 5.</b> Factores, niveles y respuesta de los experimentos a realizar según el diseño experimental.....	46
<b>Tabla 6.</b> Condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de los HAP.....	54
<b>Tabla 7.</b> Iones de cuantificación y confirmación utilizados en el análisis de HAP por CG-EM.....	56
<b>Tabla 8.</b> Precios estimados del DMS diseñado por Huckins <i>et al.</i> en el año 2006 y el confeccionado para la presente investigación.....	63
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de ácidos grasos del aceite de: soya, girasol, maíz y oliva.....	64

<b>Tabla 10.</b> Gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos(F.H.A) extraída por mL de aceite para cada ensayo del diseño experimental.....	67
<b>Tabla 11.</b> Resultados estadísticos obtenidos del análisis de varianza con dos factores.....	71
<b>Tabla 12.</b> Prueba a posteriori de diferencia mínima significativa de Fisher aplicada a los resultados del análisis de varianza.....	72
<b>Tabla 13.</b> Tiempos de retención de los HAP en estudio.....	74
<b>Tabla 14.</b> Valores estimados de la abundancia de los picos cromatográficos obtenidos para cada condición del diseño experimental.....	77
<b>Tabla 15.</b> Gramos de la fracción de hidrocarburos aromáticos por mL de aceite obtenida de la exposición del DMS.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
<b>Figura 1.</b> Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos listados por la Agencia para la Toxicidad de Sustancias y Registro de Enfermedades.....	5
<b>Figura 2.</b> Membrana Semipermeable de polietileno de baja densidad.....	21
<b>Figura 3.</b> Esquema simplificado de la difusión pasiva en Dispositivos de Membrana Semipermeable.....	22
<b>Figura4.</b> Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) comercial.....	23
<b>Figura 5.</b> Esquema general de la metodología empleada.....	42
<b>Figura 6.</b> (A) Sellado de la membrana semipermeable; (B) Membranas rellenas con aceite de soya y selladas en ambos extremos.....	44
<b>Figura 7.</b> Esquema del procedimiento para preparar la solución de estudio.....	48
<b>Figura 8.</b> Fotografía de los montajes de la exposición de las membranas a la solución de estudio.....	49
<b>Figura 9.</b> Procedimiento de extracción. (A) Membrana colocada en recipiente con 80 mL de hexano; (B) Muestras en el baño de ultrasonido; y (C) Limpieza de la membrana.....	50
<b>Figura 10.</b> Esquema del empacado de la columna cromatográfica.....	52

<b>Figura 11.</b> Fotografías de las columnas cromatográficas. (A) Montaje simultáneo de tres columnas; (B) Separación de la fracción aromática vista con una lámpara UV.....	53
<b>Figura 12.</b> Rampa de calentamiento utilizada para la separación de los HAP en el análisis por CG-EM.....	55
<b>Figura 13.</b> Fotografías del dispositivo colocado a la condición óptima de muestreo (A) DMS suspendido en el recipiente de vidrio; (B) Sistema cubierto con papel de aluminio para evitar la fotólisis de los HAP.....	58
<b>Figura 14.</b> Fotografías del DMS elaborado. (A) Disposición de dos membranas semipermeables en un soporte de acrílico; (B) Colocación de la tapa; (C) Canasta protectora de plástico.....	60
<b>Figura 15.</b> Comparación de los DMS. (A) Modelo propuesto por Huckins <i>et al.</i> en el 2006; (B) Diseño construido para el presente trabajo de investigación.....	62
<b>Figura 16.</b> Gráfico de medias e intervalos de confianza para las condiciones establecidas en el diseño experimental.....	70
<b>Figura 17.</b> Orden de elución de los analitos en estudio. Patrón de 0,2975 mg/L preparado en acetonitrilo a partir de una mezcla con los compuestos puros.....	74
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas correspondientes a las condiciones del diseño experimental. (A) 8 horas sin agitación; (B) 8 horas con agitación; (C) 48 horas sin agitación; (D) 48 horas con agitación.....	76

## 1. INTRODUCCIÓN

La descarga al ambiente de sustancias tóxicas, producidas por el hombre, ha generado gran preocupación a nivel mundial por el riesgo que implica para la salud humana. Como consecuencia inmediata del crecimiento demográfico se ha incrementado el deterioro ambiental de los diversos medios, entre los que destaca el medio acuático, esencial para el desarrollo de la vida. La calidad de las aguas en ambientes lacustres, fluviales y costeros es tema de preocupación, ya que, los derrames de contaminantes en dichas áreas cada vez son mayores. Se estima, por ejemplo, que las descargas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) alcanzan anualmente la cantidad de 230.000 toneladas <sup>[1]</sup>.

Los ecosistemas acuáticos constituyen reservorios importantes para el desarrollo de la vida, actualmente el mayor grado de contaminación es producido por un grupo de compuestos que tienden a bioacumularse en los tejidos adiposos de los seres vivos como lo son los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), son sustancias que se degradan lentamente en el ambiente, son tóxicas y tienen la capacidad de transportarse largas distancias <sup>[2]</sup>. Dentro del grupo de los COP se encuentran los HAP, los cuales son sustancias con propiedades carcinógenas y de alto impacto ambiental, estos compuestos se encuentran en concentraciones elevadas en los cuerpos de agua, lo que ha traído como consecuencia la contaminación de ríos y lagos a pesar de que estos compuestos orgánicos presentan una baja solubilidad <sup>[3]</sup>. Debido al daño que representan los HAP para el medio ambiente surge la necesidad de desarrollar y optimizar métodos analíticos que permitan evaluar cuáles de estos compuestos se encuentran presentes y determinar la concentración en la que se encuentran en los ambientes acuáticos. La parte crítica de cualquier procedimiento analítico ambiental,

especialmente en la matriz acuosa, está en el muestreo. Como una alternativa conveniente en el estudio de los HAP, surgió a finales de los años ochenta, la técnica de Dispositivos de Membrana Semipermeable (DMS), que permite evaluar contaminantes orgánicos lipofílicos en los más diversos medios en los que se desarrolla la vida y a muy bajas concentraciones en el orden de los ppb (partes por billón) <sup>[4]</sup>. Los DMS permiten calcular un promedio de la concentración de cada contaminante en el agua, mientras dura la exposición a los mismos en las condiciones ambientales reales <sup>[5]</sup>, es decir, que pueden ser colocados en aguas altamente contaminadas, en donde no es posible el empleo de biomonitores, como los moluscos y otros organismos vivos, debido a que éstos no logran sobrevivir en ciertas condiciones ambientales extremas de contaminación <sup>[3]</sup>.

En Venezuela, hasta donde se tiene conocimiento no existen estudios sobre la detección y cuantificación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en sistemas de agua dulce. Los estudios realizados se han enfocado principalmente en aguas marinas <sup>[3]</sup>, partículas atmosféricas <sup>[6,7]</sup> y sedimentos <sup>[8]</sup>, debido a las explotaciones petroleras y la quema de combustibles fósiles. Es a partir de las investigaciones sobre sedimentos que se infiere la presencia de HAP en las aguas de ríos como el Río Tuy y sus afluentes, provenientes de contaminación antrópica (fábrica de pinturas, talleres mecánicos, desechos domésticos) y pirogénica (incendios forestales) <sup>[8]</sup>. Así mismo, existen trabajos sobre la determinación de plaguicidas en aguas superficiales de algunas zonas del Occidente del país, desarrollados por la Universidad de los Andes y recopilados por el Ministerio del Ambiente <sup>[9]</sup>, que sugieren que estas zonas se encuentran afectadas por los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), destacando dentro de este grupo, los HAP.

Es por ello, que se plantea como alcance de este trabajo de investigación optimizar una técnica de muestreo mediante la confección de un muestreador pasivo basado en el diseño de Huckins *et al.* en el año 2006, que permita aplicar la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) en muestras de agua adaptada las condiciones medioambientales y socioeconómicas de Venezuela, con la finalidad de encontrar la condición óptima de muestreo que pueda ser aplicada posteriormente en ambientes naturales de agua dulce, contribuyendo así con los avances en la determinación de HAP en ambientes acuáticos.

A continuación se muestran los apartados que contemplan los fundamentos y bases teóricas que sustentan esta investigación. Así mismo, se presentan algunos trabajos previos que han sido seleccionados como los más relevantes y que sustentan el propósito del presente trabajo, la metodología experimental empleada y los resultados obtenidos. También se describen las técnicas e instrumentos que se utilizaron en la recolección de datos y los procedimientos estadísticos empleados para darle validez y confiabilidad a los mismos.

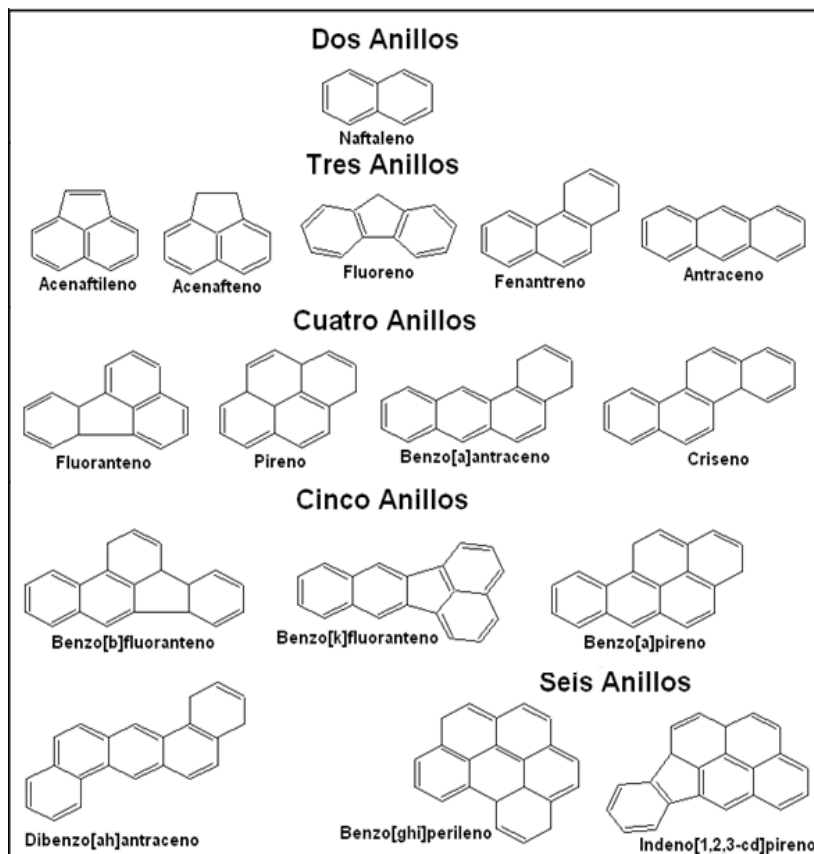
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este apartado se describen los conceptos relacionados a: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, sus propiedades fisicoquímicas, formación y fuentes de emisión, distribución en el medio ambiente, HAP en el aire, agua y suelos, efectos sobre la salud, muestreo pasivo, tipos de muestreadores, dispositivos de membrana semipermeable (DMS), ventajas y desventajas de los DMS, técnica de extracción por ultrasonido, métodos de análisis empleados para la detección de los HAP y tratamiento estadístico de los datos.

### 2.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), también conocidos como *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAHs por sus siglas en inglés), son compuestos formados por varios anillos bencénicos que se han fusionado. Están compuestos principalmente de carbono e hidrógeno por lo que reciben el nombre de “hidrocarburos”. Por otra parte, el olor característico del benceno hace que por extensión, todos los compuestos derivados del anillo bencénico se denominen “aromáticos” y finalmente, el hecho de que la mayoría de estos compuestos posean varios anillos les otorga su carácter de “policíclicos” <sup>[10]</sup>. Los HAP se forman durante la combustión incompleta del carbón, aceites, gases, madera, residuos domésticos y en general sustancias de origen orgánico. Se encuentran de forma natural en el petróleo, depósitos de alquitrán y como productos de la utilización de combustibles, ya sean fósiles o biomasa. Como contaminantes, tanto en el medio ambiente como en el entorno laboral, han despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como carcinógenos <sup>[9]</sup>. Pueden ser divididos en alternantes, los que contienen solamente

anillos bencénicos, y no alternantes, los que presentan también anillos aromáticos distintos del benceno, como por ejemplo el acenaftileno (ver figura 1). Aunque en el medio ambiente se conocen cientos de HAP entre simples y sustituidos, sólo 16 resultan ser más tóxicos. La comunidad científica investiga fundamentalmente estos 16 compuestos considerados prioritarios por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR por sus siglas en inglés) y por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA-USA por sus siglas en inglés) <sup>[11]</sup>.



**Figura 1.** Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos listados por la Agencia para la Toxicidad de Sustancias y Registro de Enfermedades <sup>[11]</sup>.

### 2.1.1 Propiedades físicas y químicas de los HAP

Los HAP son compuestos que presentan propiedades físico-químicas muy heterogéneas. En general, son lipofílicos, es decir, que tienden a unirse a sustancias grasas, y a disolverse en ellas. Este carácter lipofílico se incrementa con su complejidad y con la masa molecular, es decir, cuantos más átomos y anillos los forman, mayor es su afinidad por las grasas <sup>[10]</sup>. Las características comunes de estas sustancias son puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja y solubilidad en agua muy baja. Pero estas propiedades varían al aumentar el peso molecular y tamaño de la molécula. Frecuentemente son bioacumulados y concentrados en diversas matrices medioambientales, en función de su persistencia <sup>[11]</sup>. Los sistemas conjugados de orbitales  $\pi$  de los HAP son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es pequeña, dependiendo de su carácter aromático, los HAP absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico <sup>[12]</sup>.

Químicamente, los HAP reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce la saturación, conservándose el sistema de anillos. La mayoría de ellos sufren foto-oxidación, siendo ésta una forma para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de foto-oxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirse a quinonas. Los HAP reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o ácido nítrico. Por ejemplo, el antraceno puede oxidarse a antraquinona por acción del ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) o dar un derivado nitrogenado mediante una reacción de sustitución con dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ). El hecho de que los HAP considerados cancerígenos no reaccionen con otras sustancias no significa que se inactiven como tal; por el contrario, muchos de ellos se transforman en cancerígenos más potentes que el correspondiente compuesto progenitor <sup>[11]</sup>. La Tabla 1 contiene las características

fisicoquímicas más resaltantes de los 16 HAP seleccionados por la EPA-USA como contaminantes prioritarios y de mayor impacto ambiental.

**Tabla 1.** Propiedades Físico-Químicas para 16 HAP<sup>[11]</sup>.

HAP	Fórmula Química	Número de anillos	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Presión de vapor (mmHg)	Solubilidad en agua (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub>
<b>Bajo peso molecular</b>						
Naftaleno	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	2	128,17	7,5x10 <sup>-1</sup>	31	3,36
Acenaftileno	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	3	152,20	2,9x10 <sup>-2</sup>	16	4,03
Acenafteno	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	3	154,21	4,5x10 <sup>-3</sup>	3,8	3,55
Fluoreno	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	3	166,20	3,2x10 <sup>-4</sup>	1,98	4,18
Fenantreno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	3	178,20	6,8x10 <sup>-4</sup>	1,20	4,57
Antraceno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	3	178,20	1,7x10 <sup>-5</sup>	7,6x10 <sup>-2</sup>	4,54
<b>Mediano peso molecular</b>						
Fluoranteno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4	202,26	5,0x10 <sup>-6</sup>	0,26	5,22
Pireno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4	202,30	2,5x10 <sup>-6</sup>	7,7x10 <sup>-2</sup>	5,18
Benzo[a]antraceno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	4	228,29	2,2x10 <sup>-8</sup>	1,0x10 <sup>-2</sup>	5,91
Criseno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	4	228,30	6,3x10 <sup>-7</sup>	2,8x10 <sup>-3</sup>	5,91
<b>Alto peso molecular</b>						
Benzo[b]fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	252,30	5,0x10 <sup>-7</sup>	1,2x10 <sup>-3</sup>	6,50
Benzo[k]fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	252,30	9,6x10 <sup>-11</sup>	7,6x10 <sup>-4</sup>	6,20
Benzo[a]pireno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	252,30	5,6x10 <sup>-9</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>	6,50
Dibenzo[a,h]antraceno	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	5	278,35	1,0x10 <sup>-10</sup>	5,0x10 <sup>-4</sup>	6,20
Benzo[g,h,i]perileno	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	276,34	1,0x10 <sup>-10</sup>	2,6x10 <sup>-4</sup>	7,10
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	276,30	1,0x10 <sup>-11</sup>	6,2x10 <sup>-2</sup>	6,50

### 2.1.2 Formación de los HAP

La formación de los HAP se considera que ocurre en dos distintos pasos de reacción: pirólisis y pirosíntesis durante los procesos de combustión incompleta de la materia orgánica en general. En la pirólisis, los compuestos orgánicos son parcialmente craqueados a moléculas más sencillas, inestables a altas temperaturas. Esto es seguido por la pirosíntesis, o fusión de fragmentos dentro de estructuras de mayor peso molecular y relativamente más estables. A pesar de la gran cantidad de diversos HAP formados durante estas reacciones, sólo un número limitado ingresa al ambiente. En el año 2003, Holland y Turekian, indican que esto se debe a que los HAP inicialmente formados, por sí mismos, pueden ser destruidos durante la combustión, como un resultado de reacciones secundarias que producen la formación tanto de estructuras altamente condensadas o la oxidación de carbón <sup>[13]</sup>.

Los combustibles que forman los HAP son: metano, otros hidrocarburos, hidratos de carbono, ligninas, péptidos, etc. Sin embargo, los compuestos insaturados y las estructuras cíclicas suelen favorecer la formación de estos compuestos orgánicos. Los HAP se liberan de la zona de combustión en forma de vapores y debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría, se condensan en el acto sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas. En general, la tasa de formación de estos poliaromáticos depende de las condiciones de combustión. Una combustión que genere mucho de humo negro, dará lugar a una mayor cantidad de estos hidrocarburos por masa de compuesto quemado <sup>[13]</sup>.

### 2.1.3 Fuentes de emisión de los HAP

Existen dos fuentes responsables de la presencia de HAP en el ambiente, la natural y la antropogénica. Entre las fuentes de origen natural destacan la actividad volcánica y lixiviación de mantos de carbón <sup>[13]</sup>, aunque al tratarse de focos muy esporádicos es difícil estimar su contribución <sup>[14]</sup>. El petróleo y en general los combustibles fósiles contienen de forma natural HAP en bajas concentraciones (alrededor del 1%), dependiendo en gran parte del origen del crudo <sup>[10]</sup>. En los dos últimos siglos, el creciente uso de combustibles para aplicaciones industriales, calefacción y transporte, ha generado un aporte muy sustancial de estos compuestos <sup>[14]</sup>. También se incorporan HAP a la atmósfera mediante el desgaste de los neumáticos, las partículas de asfalto que se desprenden de la carretera y los residuos de aceites lubricantes. El tráfico vehicular es una fuente de emisión de HAP muy importante en áreas urbanas, donde se han hallado las concentraciones más elevadas de estos compuestos. No obstante, en zonas naturales la presencia de HAP ha cobrado importancia en los últimos años debido al impacto causado por la creciente densidad de tráfico a nivel general <sup>[13]</sup>.

Estudios más recientes, Lehndorff y Schwark en el año 2004 <sup>[15]</sup>, clasifican a los HAP según su origen *pirogénico*: procedentes de la combustión de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas naturales (incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc.) o antropogénicas (utilización de combustibles fósiles, incineración de residuos, craqueo del petróleo, emisiones de vehículos, procesos industriales de gasificación, etc.) que ocurren a altas temperaturas y *petrogénico*: procedentes de vertidos accidentales o intencionados de petróleo y sus derivados en menor proporción <sup>[15]</sup>. Los HAP de origen pirogénico se forman por la ruptura o “craqueo” a altas temperaturas de la materia orgánica en compuestos de bajo peso molecular que son rápidamente recombinados en estructuras de HAP no alquilados. Generalmente, entre

los HAP de origen pirogénico predominan los compuestos de alto peso molecular (compuestos formados por más de 3 anillos aromáticos) frente a los más ligeros. De hecho, la misma cantidad de materia orgánica quemada en iguales condiciones pero a diferente temperatura puede emitir cantidades muy distintas de estos compuestos <sup>[15]</sup>.

Los HAP de origen petrogénico se crean durante los procesos diagenéticos, en los que la materia orgánica sedimentada sufre una serie de procesos geoquímicos naturales dando lugar a la formación de estos compuestos. Estos procesos ocurren a relativa baja temperatura (<150°C) y durante tiempo prolongado dando lugar a la formación de petróleo y combustibles fósiles que contienen HAP. Se trata generalmente de poliaromáticos de bajo peso molecular (compuestos de 2 a 4 anillos aromáticos) que en el medio ambiente se encuentran en combinación con los HAP pirogénicos. Una diferencia importante entre los HAP de origen pirogénico y petrogénico es la persistencia en el medio ambiente. Este hecho se debe, en parte, a que la liberación de HAP petrogénicos al medio ambiente es menor que los de origen pirogénico. No obstante, estos últimos son más persistentes y se encuentran más protegidos frente a reacciones de degradación por la asociación en forma de aglomerado <sup>[15]</sup>.

Aunque esta clasificación es simple, no siempre resulta útil para discernir las fuentes de HAP en un sitio dado debido a que: i) un mismo compuesto puede provenir de diferentes fuentes; ii) dependiendo de la temperatura de combustión, duración del proceso, las condiciones de la llama (oxígeno) y del tipo de material orgánico se obtienen perfiles de HAP diferentes y iii) una vez expuestos, sufrirán procesos de transformación que dependerán de las características químicas de los compuestos y de las variables ambientales <sup>[15]</sup>.

### 2.1.3.1 Otras fuentes menos comunes: el tabaco y los alimentos

Una de las formas de combustión incompleta de la materia orgánica y que es considerada de origen antropogénico es la que conlleva el hábito de fumar. Entre los muchos productos que se originan en la combustión, el humo del tabaco contiene cantidades importantes de HAP, de hecho, se encuentran tanto en el humo directamente inhalado por el fumador, como en el que se exhala después, sin embargo, al igual que ocurre con las fuentes de origen natural, el humo del tabaco es difícil de evaluar por su carácter irregular <sup>[10]</sup>.

Algunos HAP pueden formarse también como productos de la pirólisis de los carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos. De esta manera, muchos alimentos al ser procesados, especialmente las carnes elaboradas a la parrilla en que la cocción se produce a elevadas temperaturas y en contacto directo con la llama, forman HAP en su superficie <sup>[16]</sup>. Lo mismo ocurre en los procesos de ahumado del pescado o carnes, donde se absorben HAP provenientes de la combustión del carbón o madera empleada <sup>[10]</sup>. Se ha estudiado recientemente la detección de HAP en cereales <sup>[17]</sup>, lo cual, hace necesaria la investigación de estos compuestos en alimentos y agua que son para el consumo humano. Es importante destacar que existen múltiples fuentes de los poliaromáticos, por tanto es de esperarse que ellas puedan llegar a los ambientes acuáticos por efluentes industriales como domésticos, depósitos de partículas atmosféricas y derrames de petróleo.

## 2.1.4 Distribución de los HAP en el medio ambiente

Las reacciones de combustión y pirólisis son procesos muy complejos y de amplio alcance, lo que implica una distribución de los HAP en todos los compartimientos ambientales: aire, suelo, agua, sedimentos, tejidos biológicos incluyendo algunos alimentos <sup>[10]</sup>. Además, presentan amplios rangos de concentración, dependiendo de la matriz en la que se encuentran <sup>[7]</sup>.

### 2.1.4.1 HAP en el aire

Los HAP se encuentran fundamentalmente como contaminantes atmosféricos. En el aire están presentes como vapores o gases, también se encuentran adheridos a la superficie de pequeñas partículas sólidas. La distribución de estos compuestos entre la fase gas y las partículas atmosféricas está condicionada por factores como la temperatura ambiente, la humedad relativa, las propiedades y concentración de los HAP y la composición química de los aerosoles <sup>[7]</sup>. Durante el tiempo de residencia en la atmósfera, los HAP pueden reaccionar con compuestos atmosféricos como el ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre para transformarse en dionas, nitro y dinitro derivados y ácidos sulfónicos, respectivamente. De modo que es posible generar compuestos más polares y, por lo tanto, más solubles en agua que los compuestos iniciales. Igualmente pueden sufrir oxidaciones fotoquímicas dando lugar a quinonas, fenoles y dihidrodioles, generando algunos productos de carácter mutagénico. Los estudios más recientes para determinar HAP en Venezuela, se han enfocado en el compartimiento atmosférico empleando biomonitores <sup>[7,18]</sup>, justamente por los procesos involucrados en la explotación petrolera y relacionada con la combustión de vehículos <sup>[19]</sup>. En general, esta contaminación consiste en mezclas de HAP, no de compuestos

aislados; la composición específica de cada emisión depende de varios factores, tales como: el tipo de combustible utilizado, sus propiedades, y el tipo de tecnología utilizada para su combustión. Por otra parte, los HAP en general, se emiten unidos a otras partículas y una vez en el aire pueden sufrir rápidamente procesos de oxidación o degradación, favorecidos por la presencia de otros contaminantes y de la radiación solar <sup>[10]</sup>.

#### **2.1.4.2 HAP en el agua y suelo**

En el suelo, los HAP impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad y textura del suelo pueden ser procesos más o menos lentos <sup>[13]</sup>. De igual manera, los HAP se unen a otras partículas y algunos casos pueden contaminar los acuíferos. La degradación de algunos HAP en el suelo y en el agua puede llevar semanas y meses, siendo causada en su mayoría por la acción de microorganismos <sup>[13]</sup>. La contaminación de suelos donde se desarrollan actividades industriales, agrícolas y humanas en general, se debe principalmente a la inadecuada gestión del mismo, la cual ha llevado a la disposición deliberada o accidental de desechos sobre el suelo, tanto de materia orgánica, solventes o residuos peligrosos, perjudicando a su vez cualquier actividad posterior relacionada con este recurso, lo que se traduce en un grave problema mundial <sup>[14]</sup>. Algunos HAP encontrados en el suelo son el fluoranteno, pireno y criseno <sup>[8]</sup>, y son el resultado en parte, de la combustión de fuentes naturales, así como también, a partir de actividades antropogénicas contaminantes.

En el ambiente acuático, los HAP están presentes en estado de partículas suspendidas y disueltos, también son liberados mediante vertidos directos, como en los vertidos de crudo. De igual manera, pueden entrar a las aguas superficiales a través de las descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales, los cuales a su vez pueden ser liberados a los suelos quedando adsorbido sobre el sedimento arcilloso [8]. Los HAP tienden a adsorberse a cualquier material particulado debido generalmente a su baja solubilidad; su solubilidad es dependiente de la temperatura, pero puede ser promovida por la presencia de materia orgánica natural, tal como las sustancias húmicas [12].

Las aguas constituyen reservorios importantes de la contaminación por HAP desde donde estos se distribuyen hacia los sedimentos y la biota. En aguas naturales, es común encontrar concentraciones de HAP totales que van desde valores menores a 50 ng/L para sitios no contaminados hasta 6 g/L en los ríos contaminados. En agua potable las concentraciones oscilan entre 0,02 y 1,8 ng/L. Es por esto que, son clasificados por varios autores como contaminantes orgánicos persistentes no intencionales. Según la Unión Europea, para las aguas superficiales empleadas como fuente de abastecimiento para agua potable, el límite establecido para la suma de fluoranteno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(ghi)perileno e indeno ([cd]pireno) es de 1 mg/L [20].

### **2.1.5 Efectos de los HAP sobre la salud y el medio ambiente**

Los HAP pueden entrar al organismo por diferentes vías, debido a que están presentes fundamentalmente en el aire contaminado, la principal vía de entrada es respirando el aire que los contiene. Además, es posible ingerir alimentos o aguas que se encuentren contaminadas, así mismo, algunos HAP pueden ser absorbidos por la piel, suelen

acumularse y sus efectos pueden producir daños en el organismo a largo plazo, incluso en un período de tiempo de un año, según el nivel de exposición. Las personas que viven cerca de sitios donde ocurren emanaciones industriales que contienen estos compuestos suelen estar expuestas al aire contaminado, sin embargo, no se sabe con certeza la velocidad y el grado de absorción de los HAP en los pulmones. Una vez en el organismo, estos compuestos pueden llegar a todos los tejidos del cuerpo que contengan grasa, donde tienden a almacenarse. De esta manera, son más abundantes en el hígado, los riñones, y en general en los depósitos grasos del cuerpo, como el tejido adiposo <sup>[10]</sup>. Un aspecto importante para comprender la actividad biológica de los HAP es su metabolismo, es decir, la serie de transformaciones que sufren una vez absorbidos por el organismo. Como cualquier sustancia externa, este trata de eliminarlos mediante procesos que realizan las proteínas que se encuentran en el organismo llamadas enzimas <sup>[10]</sup>.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) ha determinado que: el benzo[a]antraceno y el benzo[a]pireno son probables carcinógenos humanos; el benzo[b]fluoranteno, el benzo[j]fluoranteno, el benzo[k]fluoranteno y el indeno[1,2,3-c,d]pireno son posibles carcinógenos humanos; y antraceno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[e]pireno, criseno, fluoranteno, fluoreno, fenantreno y el pireno no son clasificables como carcinógenos en los seres humanos. Por otra parte, la EPA-USA ha determinado que el benzo[a]antraceno, el benzo[a]pireno, el benzo[b]fluoranteno, el benzo[k]fluoranteno, el criseno, el dibenzo[a,h]antraceno y el indeno[1,2,3-c,d]pireno son probables carcinógenos humanos <sup>[11]</sup>.

## **2.2 MUESTREO PASIVO**

El muestreo pasivo puede ser definido en su sentido más amplio como cualquier técnica de muestreo basado en el libre flujo de moléculas de un analito desde el medio en que se encuentra la muestra (aire, agua o suelo) a una fase de recepción en un dispositivo de muestreo o medio colector durante un período de tiempo <sup>[21]</sup>. Los métodos de muestreo pasivo han demostrado a lo largo de diversas investigaciones su uso como herramientas para la medición de las concentraciones acuosas de una amplia gama de contaminantes. Un muestreador pasivo debe permitir analizar la presencia o ausencia de contaminantes, así como también estudiar la variación de espacio-tiempo de los HAP en el ambiente que se esté muestreando <sup>[21]</sup>.

### **2.2.1 Tipos de muestreadores pasivos**

Los muestreadores pasivos han sido empleados para acumular un analito por un período de tiempo determinado, aumentando así su concentración y por ende, elevar su sensibilidad según la técnica de análisis a la cual sea sometido, además, pueden ser evaluados los cambios estacionales o aleatorios que pueda sufrir el sistema y que no son reportados en un muestreo activo. Además, estos muestreadores se utilizan frecuentemente debido a la necesidad de controlar los niveles de concentración de contaminantes en el medio ambiente para satisfacer los requisitos de los marcos legales, ya que muchos de estos compuestos como se ha mencionado anteriormente, pueden presentar una amenaza tanto para salud humana como para los ecosistemas <sup>[21]</sup>. Se han desarrollado ciertos tipos de muestreadores pasivos, los cuales, han sido optimizados a lo largo de los años para el análisis de muestras de contaminantes en los diferentes compartimientos que conforman el medio ambiente. Entre los dispositivos

de muestreo pasivo se encuentran los siguientes: Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS), el cual, se utiliza principalmente como muestreador pasivo debido a que permite la acumulación de contaminantes orgánicos que se encuentran en medios acuáticos, sedimentos o en la atmósfera a través un dispositivo que es colocado en el sitio de muestreo durante un periodo de tiempo. Otro tipo de muestreo pasivo es la micro extracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés), es una técnica que se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra que está recubierta de un soporte, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o empleando un disolvente orgánico. La extracción se considera completa cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra <sup>[17]</sup>. El muestreador de polímero recubierto de vidrio (POG, por sus siglas en inglés), es usado como sensor de fugacidad tanto en aire exterior como interior. Así mismo, han sido desarrollados otros dispositivos que se emplean en el muestreo de compuestos orgánicos como los que se presentan en la tabla 2, la cual compara los aspectos clave y las características de rendimiento de los muestreadores pasivos <sup>[21]</sup>. De los siete examinados, sólo unos pocos presentan superposición de funciones. Claramente, no hay un dispositivo que pueda proporcionar los datos deseados para todos los escenarios de exposición. Además, un problema inherente a todos los muestreadores pasivos diseñados para alcanzar el equilibrio es la amplia gama de coeficientes de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y coeficiente de reparto aire-agua ( $K_{aw}$ ) requeridos de la variedad de compuestos orgánicos de interés <sup>[21]</sup>.

**Tabla 2.** Comparación de las características de los muestreadores pasivos y sus aplicaciones para compuestos orgánicos. Modificado de Huckins *et al.* [21].

	DMS	MEFS	PRV	PEBD (tiras)	MPPCIS	DMICOP	SMP
<b>Clasificación</b>	Integrado ( $\log K_{ow}S > 4,5$ )	Equilibrio ( $\log K_{ow}S < 6$ )	Equilibrio ( $\log K_{aw}S < 10$ )	Integrado ( $\log K_{ow}S > 5$ )	Integrado	Integrado	Integrado
<b>Medios en donde se encuentra la muestra</b>	Agua superficial, agua subterránea, aire, sedimentos y suelo.	Agua superficial, agua subterránea, sedimentos y suelo.	Agua superficial y aire	Agua superficial, agua subterránea, sedimentos y aire	Agua superficial	Agua superficial, agua subterránea y sedimentos.	Agua superficial, agua subterránea, aire, sedimentos y suelo.
<b>Tipo de compuestos muestreados</b>	Compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs)	Compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs)	Compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs)	Compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs)	Compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs)	Compuestos orgánicos hidrofílicos (COHF)	Compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs) y Compuestos orgánicos hidrofílicos (COHF)
<b>Control de la velocidad de muestreo</b>	Capa límite externa, aire o agua. ( $\log K_{ow}S > 4,5$ )	Capa límite externa, aire o agua. ( $\log K_{ow}S > ?$ )	Capa límite externa, aire o agua.	Capa límite externa, aire o agua. ( $\log K_{ow}S > ?$ )	Capa límite externa, aire o agua. ( $\log K_{ow}S > ?$ )	Capa límite externa, aire o agua	Membrana difusiva
<b>A/V<sup>c</sup></b>	90 cm <sup>-1</sup> (91,4 × 2,5 cm)	1400 cm <sup>-1</sup> (7 μm de película)	104 cm <sup>-1</sup> (1 μm de película)	230 cm <sup>-1</sup> (85 μm de película)	0,1 cm <sup>-1</sup>	150 cm <sup>-1</sup>	110 cm <sup>-1</sup>
<b>Área</b>	460 cm <sup>2</sup> (91,4 × 2,5 cm)	0,4 cm <sup>2</sup> , 7 μm film × 10 cm	290 cm <sup>2</sup> ; 6,8 × 7,0 cm	460 cm <sup>2</sup> (91,4 × 2,5cm)	23 cm <sup>2</sup>	41 cm <sup>2</sup>	16 cm <sup>2</sup>
<b>Volumen de la fase líquida adsorbente</b>	5,0 μL	0,28 μL 7 μm film	29 μL 1 μm film	2,0 μL 85 μm film	2,0 × 105 μL	240 μL	145 μL C18
<b>Capacidad de sorción</b>	560 L (w) 360 m <sup>3</sup> (a)	0,027 L (w) 18 L (a)	16 L (w) 10,4 m <sup>3</sup> (a)	79 L (w)	1,3 × 105 L (w)	?	75 L (w)

<sup>c</sup>A/V Área de superficie (cm<sup>2</sup>) de la toma de muestras dividida por el volumen (cm<sup>3</sup>) de la fase de acumulación.

KowS: producto del coeficiente de reparto octanol-agua y la membrana.

KawS: producto del coeficiente de reparto aire-agua y la membrana.

DMS: dispositivos de membrana semipermeable

MEFS: microextracción en fase sólida

PRV: polímero recubierto de vidrio

PEBD: polietileno de baja densidad

MPPCIS: muestreador pasivo de pre-concentración "in situ"

DMICOP: dispositivo para el muestreo integrado de compuestos orgánicos polares

SMP: sistema de muestreo pasivo

## 2.3 FUNDAMENTO TEÓRICO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Los HAP son ampliamente conocidos por ser compuestos no polares o débilmente polares que presentan una gran afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas presentando a su vez una baja solubilidad en agua <sup>[22]</sup>. En el proceso de extracción líquido-líquido, en el cual se basa el fundamento de determinación de HAP en muestras acuosas, se incluye la distribución de un compuesto orgánico entre dos solventes que son inmiscibles entre sí. Generalmente, uno de los solventes es agua y el otro un solvente orgánico no polar. Aprovechando la diferencia de solubilidad de un compuesto en un par de solventes, pueden ser selectivamente transportados de una fase líquida a otra durante el proceso de extracción. El coeficiente de distribución octanol-agua ( $K_{ow}$  por sus siglas en inglés) de una sustancia, también llamado coeficiente de partición ( $P_{ow}$  por sus siglas en inglés) es el cociente, en el equilibrio, de las concentraciones, que mide la solubilidad diferencial de esa sustancia en una mezcla bifásica formada por dos solventes inmiscibles entre sí, como por ejemplo n-octanol y agua. El uso de n-octanol, como referencia, es porque se trata de un compuesto orgánico el cual simula acertadamente el carácter hidrofóbico y tiene una gran afinidad hacia los lípidos de una sustancia que se encuentra disuelta en agua, grasas o compuestos no polares que puedan estar disueltos en agua, la ecuación (1) expresa cómo calcular este coeficiente de partición <sup>[23]</sup>.

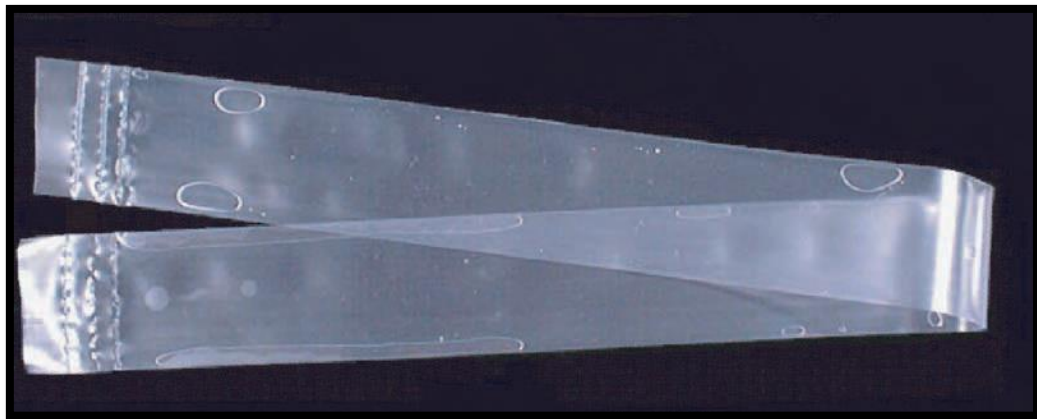
$$K_{ow} = K_{octanol/agua} = \frac{[soluto]_{octanol}}{[soluto]_{agua}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

El valor de  $K_{ow}$  de una sustancia está relacionado con su capacidad de adsorción o su potencial de bioconcentración en tejidos grasos. Un valor de  $K_{ow} \leq 3$  indica una probable movilidad y transporte de ese material por su buena solubilidad, de fácil biodegradación y se debe esperar una baja bioacumulación. Por el contrario, un valor de  $K_{ow} \geq 3$  indica una posible adsorción en tejidos grasos contribuyendo con la bioconcentración o bioacumulación, y debido a su escasa movilidad se favorece la toxicidad de estas sustancias. Por esta razón, los HAP tienen un  $K_{ow} > 3$ , lo que justifica su baja solubilidad, inmovilidad, bajas tasas de biodegradación, tendencia a bioacumularse y ser persistentes en el medio ambiente <sup>[22]</sup>.

## 2.4 DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE

El Dispositivo de Membrana semipermeable (DMS), (*Semipermeable Membrane Device* SPMD, por sus siglas en inglés), es un mecanismo de muestreo pasivo que se utiliza como acumulador de contaminantes lipofílicos en ambientes acuosos, sedimentos y particulado atmosférico como parte de un gran número de investigaciones en todo el mundo; imitan los sistemas biológicos para proporcionar una medida de contaminantes biodisponibles tanto en agua dulce como salada. Sin embargo, los DMS, a diferencia de la biota típica utilizada en las pruebas de contaminación, no metabolizan los compuestos secuestrados, no es específico del lugar, es mucho más fácil de extraer, y no van a sufrir una sobredosis o morir a causa de la contaminación por la acumulación del contaminante <sup>[24]</sup>.

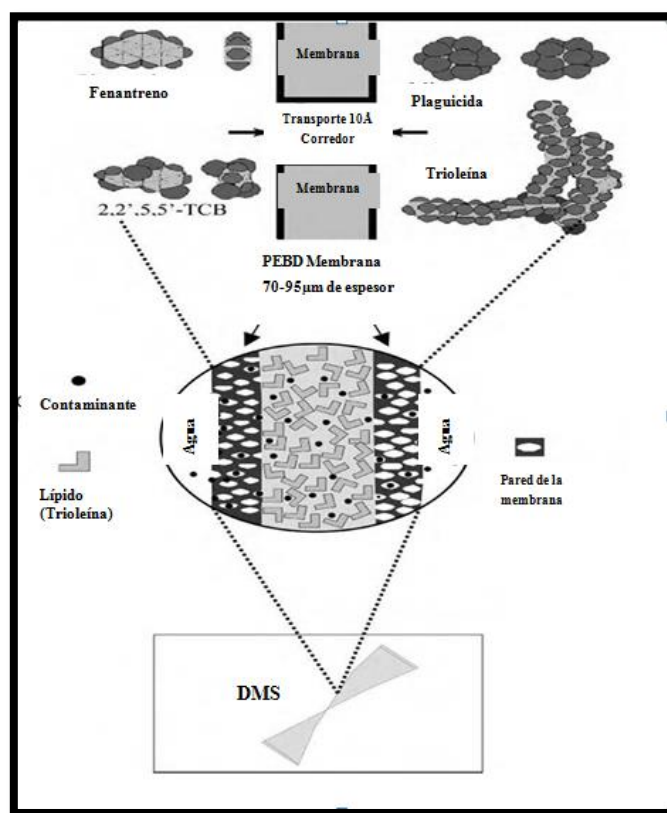
El primer DMS propuesto por Huckins *et al.* en el año 1992, ha sido empleado en varios estudios a nivel internacional, y se compone de un tubo de polietileno de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés) el cual, contiene un compuesto en el interior denominado fase secuestrante <sup>[21]</sup>. El sistema de secuestro consta de una fina capa de un compuesto orgánico lipídico de alto peso molecular como la trioleína, que disuelve y concentra los contaminantes orgánicos que traspasan la membrana (ver figura 2). El polímero a menudo se considera no permeable, pero en realidad consta de poros de menos de 10 Å de diámetro. Estos poros permiten la difusión selectiva de los productos químicos orgánicos hidrófobos, que luego son secuestrados en la fase lipídica y pueden ser evaluados o analizados por una variedad de técnicas <sup>[21]</sup>.



**Figura 2.** Membrana semipermeable de polietileno de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés) <sup>[21]</sup>.

La acumulación de los compuestos orgánicos es determinada por las afinidades relativas de éstos al medio externo e interno de la membrana. A medida que transcurre el tiempo, la concentración de las moléculas en la fase más afín se hará mayor hasta que el sistema alcance la condición de equilibrio, determinada por la afinidad de cada uno de los compuestos con la fase interna, fase secuestrante. Para que la molécula

ingrese a esta fase, debe inicialmente atravesar una capa de moléculas de agua adsorbidas en la superficie de la membrana, y en ese punto puede desprenderse de las moléculas de agua que la mantenían solvatada. Dicho proceso transcurre según la afinidad del analito hacia el agua y hacia la membrana. La figura 3 muestra una visión sencilla de este proceso, puede considerarse que la difusión de los compuestos orgánicos lipofílicos ocurre desde el medio externo hacia el interno a través de una barrera conformada por la membrana semipermeable [21].



**Figura 3.** Esquema simplificado de la difusión pasiva en Dispositivos de Membrana Semipermeable [21].



El diseño del DMS permite una localización de muestreo fijo eliminando los problemas de migración y mortalidad relacionados con los organismos acuáticos. El dispositivo está conformado por una canasta o armazón de acero inoxidable que contiene dentro un soporte del mismo material sobre el cual se dispone la membrana en forma de araña, este sistema puede ser armado o instalado rápidamente para minimizar la exposición a la atmósfera. Los tiempos de exposición recomendados varían en función del nivel previsto de los contaminantes y las temperaturas del ambiente acuático, pero por lo general, se ha encontrado que un tiempo de horas a semanas proporciona muy buenos resultados <sup>[24]</sup>. El modelo comúnmente empleado según la compañía de Tecnología en Muestreo Ambiental (EST, por sus siglas en inglés), se muestra en la figura 4.




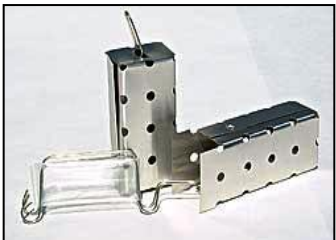
**Figura 4.** Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) comercial <sup>[24]</sup>.

Además, de proteger el DMS de golpes y organismos, y proporcionar una estructura sólida para su anclaje en el agua se coloca la canasta de acero inoxidable es capaz de dejar pasar el flujo de agua pero, a su vez puede cuidar la membrana del paso directo de la luz y evitar así la fotólisis de los HAP <sup>[24]</sup>. Debido a esto, se han desarrollado diversas presentaciones de DMS y canastas metálicas, las cuales están disponibles en función de las necesidades del muestreo a realizar; en la tabla 3 se presentan algunos de los modelos más empleados y sus principales características .

**Tabla 3.** Modelos de dispositivos de membrana semipermeable y canastas metálicas <sup>[24]</sup>.

Modelo	Dimensiones	Descripción
	<p>15 cm de alto x 16 cm de ancho. Dos anillos "D" en el cuerpo de la lata y un anillo "D" en la tapa. La distancia entre el anillo "D" en la tapa y el primero del cuerpo es 6,5 cm. Los anillos "D" son 25 mm de ancho y 19 mm de profundidad.</p>	<p>Utiliza la longitud estándar de DMS (91,4 cm) y contiene de uno a dos soportes de araña.</p>
	<p>30 cm de alto x 16 cm de ancho. Dos anillos "D" en el cuerpo de la lata y un anillo "D" en la tapa. La distancia entre el anillo "D" en la tapa y el primero sobre el cuerpo es 6,5 cm. Los anillos "D" son 25 mm de ancho y 19 mm de profundidad.</p>	<p>Puede contener hasta cinco soportes de araña y utiliza la longitud estándar de DMS (91,4cm)</p>

**Tabla 3. Continuación.** Modelos de dispositivos de membrana semipermeable y canastas metálicas <sup>[24]</sup>.

	<p>73 cm de largo x 4,5 cm de ancho.</p>	<p>Utiliza la longitud estándar de DMS (91,4cm)</p>
	<p>9.5 cm largo x 4.5 cm de ancho.</p>	<p>Es el soporte más pequeño del que se dispone y que permite realizar un muestreo sencillo utilizando uno o dos DMS de seis pulgadas.</p>

### 2.4.1 Ventajas y desventajas de los DMS

Los Dispositivos de Membrana Semipermeable, constituyen una herramienta muy útil en el proceso de captación de contaminantes orgánicos hidrofóbicos que se encuentran en los ambientes acuáticos. De igual manera, pueden emplearse como muestreadores en aguas altamente contaminadas que no estén habitadas por organismos vivos que puedan servir de biomonitores <sup>[4]</sup>. Entre otras ventajas, permite calcular la concentración promedio de un contaminante en el agua, siendo esto resultado del tiempo de exposición de un compuesto a las condiciones ambientales y climáticas, debido a que

se pueden dejar en la zona de muestreo durante largos períodos de tiempo (de semanas a meses). También, es posible percatarse de cambios bruscos en la concentración de un contaminante por eventos repentinos, tales como derrames químicos <sup>[24]</sup>.

Uno de los principales inconvenientes que se ha encontrado en la literatura con respecto al empleo de los DMS está asociado al proceso mediante el cual se extraen los contaminantes de la fase secuestrante, trioleína. Este procedimiento requiere la diálisis de la membrana, con un solvente orgánico no polar, lo cual implica el uso de grandes cantidades de solvente y largos períodos de tiempo en el análisis <sup>[3]</sup>. Sin embargo, en los últimos años se han realizado estudios de técnicas analíticas que tratan de optimizar el proceso de extracción de los contaminantes empleando métodos como extracción asistida con microondas, en donde se utiliza la radiación por microondas como fuente de calentamiento de la muestra con una mezcla de solvente para acelerar la extracción <sup>[25]</sup>, así mismo, se ha desarrollado una modificación en el proceso de diálisis empleando extracción asistida con ultrasonido, lo cual ha arrojado resultados satisfactorios en el recobro de los contaminantes de la membrana <sup>[26]</sup>. Existen otros estudios en los que se realiza la agitación directa de la membrana abierta por un extremo o cerrada, con un solvente orgánico <sup>[27]</sup>. Sin embargo, se ha encontrado que estas técnicas o han sido poco eficientes para extraer toda la concentración presente de contaminantes o colocan la trioleína en el extracto orgánico lo que dificulta luego el proceso de limpieza, encontrándose en el estudio cromatográfico señales de interferencias debidas a los productos de degradación de la trioleína o de la membrana misma que no fueron depurados. Así mismo, los métodos de limpieza también han sido mejorados y se han establecido parámetros cromatográficos para reducir las señales de las posibles interferencias <sup>[21]</sup>.

También, se han propuesto modificaciones de los dispositivos DMS para mejorar su rendimiento y abaratar su precio; tales como: el empleo de tiras de polietileno de baja densidad sin ningún tipo de relleno <sup>[28]</sup>, la sustitución del relleno de trioleína por grasas como aceites de maíz y aceite de oliva y la modificación de la membrana de polietileno con acetato de celulosa <sup>[3]</sup>. Estas alternativas que se han venido desarrollando en los últimos años constituyen una nueva forma de emplear DMS como muestreadores pasivos para el análisis de contaminantes presentes en el agua, ya que, proporcionan un menor costo y mayor disponibilidad.

## **2.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN APLICADAS SOBRE DMS**

El proceso de extracción se basa fundamentalmente en poner en contacto la muestra con un solvente adecuado. Posteriormente, la mezcla con el solvente es sometida a una serie de tratamientos de recobro de distintos rangos de agresividad, que van desde la simple agitación hasta someter la mezcla a temperaturas y presiones diferentes a las condiciones ambientales, dependiendo de la fortaleza de la interacción entre el analito y la matriz. El aumento de la temperatura del solvente generalmente mejora la solubilidad de los analitos, además, de los coeficientes de difusión y la capacidad del disolvente para debilitar la interacción analito-matriz. Así mismo, con la aplicación de presión se facilita la penetración del disolvente en los poros de la matriz permitiendo la extracción del analito. La optimización de estos parámetros hace eficiente la extracción y reducen el tiempo de análisis <sup>[29]</sup>. Las técnicas de extracción empleadas en muchos casos para la determinación de HAP en DMS están aún lejos de su estandarización, sin embargo, una de las más utilizadas consiste en la diálisis con un solvente orgánico (OSD, por sus siglas en inglés), siendo el hexano el solvente usado en la mayoría de los casos <sup>[26]</sup>.

Los estudios más recientes, sobre DMS han sido enfocados en la optimización de esta etapa de extracción, con la finalidad de disminuir principalmente la cantidad de solvente utilizado en la técnica de diálisis, lo que contribuiría con la disminución de la contaminación ambiental <sup>[26]</sup>. Es así como se ha implementado el uso de otras técnicas de extracción entre las que se encuentran: la extracción asistida por microondas y extracción asistida por ultrasonido <sup>[26]</sup>, siendo esta última, la implementada en el presente trabajo de investigación.

### **2.5.1 Extracción asistida por ultrasonido**

La frecuencia de ultrasonidos se define como sonidos cuyas frecuencias se encuentran más allá del rango perceptible por el ser humano, generalmente se encuentran entre 20 y 500 MHz <sup>[30]</sup>. El sonido, incluyendo el ultrasonido es transmitido a través de cualquier medio físico por medio de ondas que comprimen y estiran el espacio molecular a su paso por el medio. A medida que el ultrasonido va atravesando el medio, sus oscilaciones varían a su punto de salida. Cuando una onda del ultrasonido causa una presión negativa suficiente a través de un líquido, la distancia entre las moléculas del mismo excede la mínima distancia molecular requerida para mantener el líquido intacto, lo que origina que las fuerzas de cohesión se rompan y se cree un vacío. A este vacío se le conoce como burbujas de cavitación. Las colisiones entre las burbujas de cavitación constituyen la primera fuente de los efectos químicos y mecánicos de la energía del ultrasonido <sup>[31]</sup>. En el campo de la Química Analítica, los equipos de ultrasonido constituyen una herramienta muy empleada debido a su gran eficiencia en diferentes campos como la extracción de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Recientemente, el uso de ultrasonido en procesos de extracción ha sido introducido como una nueva técnica de preparación de muestras para la extracción de compuestos orgánicos de matrices líquidas y sólidas. Esta técnica se basa en el uso de

la energía ultrasónica para asegurar una mejor eficiencia en el contacto con la muestra y el solvente, permitiendo rápidas extracciones minimizando así, tanto el volumen de muestra procesada como el de solvente utilizado <sup>[31]</sup>.

En el año 2013, Bustamante *et al.* <sup>[26]</sup>, desarrollaron un nuevo procedimiento basado en la técnica de diálisis asistida por ultrasonido (UAD, por sus siglas en inglés) para la extracción de HAP contenidos en los DMS. Esta técnica utiliza sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender los contaminantes secuestrados por la trioleína de la membrana semipermeable. Las partículas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica y como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase grasa al solvente <sup>[26]</sup>. El efecto de las ondas de ultrasonido depende de muchas variables, es por ello que para obtener una extracción eficiente, es importante optimizar los parámetros operacionales en función del tipo de analito y matriz con la que se quiera trabajar <sup>[31]</sup>. Entre los factores que influyen en el proceso de extracción se encuentran los siguientes:

1. **Solvente de extracción:** debe ser elegido tomando en cuenta la polaridad y solubilidad del compuesto que debe ser extraído, en general, solventes con características similares al compuesto que quiere ser extraído proveen buenos resultados.
2. **pH de la solución extractante:** en algunos casos es necesario ajustar el pH, para asegurarse de lograr una eficiente desorción de la matriz de muestra.
3. **Volumen del solvente de extracción:** debe ser acorde al volumen de muestra, para lograr una extracción eficiente del compuesto, volúmenes mayores al óptimo no incrementan la recuperación, por lo contrario, bajo estas condiciones,

la concentración del analito se diluye causando una disminución de la sensibilidad del método y consumo innecesario del solvente.

4. **Tiempo de extracción:** el aumento de la eficiencia de extracción con el tiempo de sonicación, se obtiene hasta que se alcanza el equilibrio, tiempos mayores al óptimo producen una reducción en las recuperaciones obtenidas, probablemente por la degradación del compuesto o por la descomposición del solvente orgánico causada por las ondas del ultrasonido.
5. **Temperatura de extracción:** en general, el uso de altas temperaturas produce mejores recuperaciones que cuando se trabaja en extracciones frías. En la extracción asistida por ultrasonido, un incremento de la temperatura implica mayor eficiencia en el proceso de extracción debido al incremento del número de burbujas de cavitación y del área de superficie de contacto. Sin embargo, este efecto tiende a desaparecer cuando se trabaja a temperaturas próximas a la de ebullición. Por otra parte, hay que tener en cuenta que algunos analitos se degradan rápidamente con el aumento de la temperatura y en caso de compuestos orgánicos volátiles con altas presiones de vapor, estos pueden perderse por evaporación.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la extracción también dependerá de la posición del recipiente dentro del baño. Debido a esto es necesario tener cuidado en colocar el recipiente siempre en el mismo lugar prefijado en el baño para que se encuentre expuesto a las ondas de ultrasonidos de la misma manera y evitar así problemas en la reproducibilidad de los experimentos <sup>[32]</sup>. Esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las más modernas técnicas de extracción desarrolladas <sup>[30]</sup>. Además, ha proporcionado resultados

satisfactorios en la recuperación de los contaminantes de la membrana, y requiere poco volumen de solvente <sup>[26]</sup>.

## **2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HAP**

La elección de la metodología analítica relacionada al procedimiento de extracción y limpieza para los HAP depende de las características fisicoquímicas de los analitos, el límite de detección requerido, el nivel y tipo de interferencias, la resolución que se requiere, precisión y exactitud de los instrumentos disponibles, tiempo de análisis y costo. Independientemente de la matriz en donde se realice el análisis, se requiere la purificación del extracto para eliminar los compuestos interferentes antes del análisis cromatográfico <sup>[33]</sup>. En la mayoría de los casos este procedimiento se lleva a cabo por cromatografía en columna abierta empacada con alúmina, florisil y/o gel de sílice, en algunos casos se emplea una segunda purificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia. A través del proceso de adsorción se separan los analitos que interfieren en el análisis con intervalos de polaridad bien definidos. Entre las desventajas que presenta este procedimiento se incluyen los cambios de actividad en los adsorbentes, el uso de grandes volúmenes de solventes de alta pureza que deben ser evaporados luego para la concentración de los analitos de interés, así como el tiempo total del análisis. En el año 2003, Peña, Morales, Labastida y Capella, realizaron un estudio empleando la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) como procedimiento alternativo de purificación en la metodología analítica para la determinación de HAP en organismos marinos, este procedimiento fue comparado con el método tradicional de limpieza del extracto por cromatografía en columna abierta, en donde, el procedimiento alternativo presentó ventajas sobre el método de purificación tradicional debido a la reducción del volumen de solvente empleado, menor tiempo de análisis y bajo costo <sup>[34]</sup>.

Las técnicas empleadas para la determinación y cuantificación son: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), (HPLC y GC-MS por sus siglas en inglés respectivamente), comúnmente usadas para el análisis de compuestos orgánicos, la selectividad en la detección de los HAP mediante CLAE deriva de la respuesta de los compuestos individuales a los diversos detectores. Algunos estudios consideran que una de las mejores técnicas para determinar HAP es la cromatografía líquida con detector de fluorescencia (CLF), debido a la eficiencia en alta sensibilidad, reproducibilidad y velocidad de análisis comparado con otros métodos analíticos <sup>[35]</sup>. Así mismo, Díaz, Alfaro y Garza en el año 2001, desarrollaron un método analítico para determinar poliaromáticos a niveles trazas en agua potable mediante la técnica de Cromatografía de Gases Capilar con detección por Espectrometría de Masas (CGC-EM) <sup>[36]</sup>. En la actualidad, es la cromatografía de gases una de las técnicas analíticas más empleadas en el monitoreo ambiental y, en combinación con el detector de espectrometría de masas, constituye una herramienta esencial en el análisis de especies orgánicas en agua. El espectrómetro de masas es el mejor detector que se puede acoplar con el cromatógrafo de gases (CG), ya que presenta las ventajas de ser sensible y específico en la identificación de sustancias desconocidas o en la confirmación de la presencia de compuestos. Su alta sensibilidad, resulta de la acción del analizador que actúa como un filtro de masas, reduciendo así la interferencia de fondo. La excelente especificidad en la identificación es el resultado de los patrones de fragmentación característicos que proporcionan información acerca de la masa y la estructura molecular del analito <sup>[36]</sup>.

## 2.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

El principal propósito de la experimentación es obtener información confiable, es por ello que el desarrollo de un diseño experimental es de particular utilidad en las etapas iniciales de una investigación, sobre todo cuando están involucrados diversos factores [37]. En un diseño experimental se manipulan una o más variables, se prescribe una serie de pautas relativas sobre qué variables hay que manipular, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza lo que se va a llevar a cabo [38]. Es así como el diseño estadístico de experimentos contempla estrategias que son adecuadas para generar la información que se desea y el análisis de varianza (*Analysis Of Variance*, ANOVA por sus siglas en inglés) es una de ellas [37]. El análisis de varianza permite comparar los valores de un conjunto de datos con los valores de otro conjunto, para evaluar si son significativamente distintos o no mediante la asociación a una probabilidad (pruebas de significancia entre dos o más conjuntos numéricos simultáneamente). Además, es un procedimiento que se adapta a las características del diseño experimental usado en la obtención de los datos, no es un método fijo, se adapta a cada diseño y se puede clasificar de distintas maneras. Cuando los resultados de un experimento pueden ser afectados por dos factores, debe emplearse el análisis de varianza de dos factores o de dos vías para estudiar sus efectos e interacción entre ellos [37]. El ANOVA es utilizado para proveer soluciones a dos tipos de problemas fundamentales, por un lado, puede ser empleado para detectar la existencia de relaciones fijas entre medias de una población y para estimar los parámetro que definen tales relaciones, y por otro lado, puede ser usado para determinar la existencia de componentes de variación dentro del sistema que se esté estudiando y permitir al investigador estimar estas variaciones, las cuales inciden en la población [39].

El diseño experimental desarrollado en el presente trabajo de investigación está basado en evaluar las variables de: tiempo de exposición del dispositivo y agitación a dos niveles cada factor y en ver cuál es su efecto sobre los gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos extraídos mediante la técnica de DMS. Luego, se realizará el tratamiento estadístico correspondiente a un análisis de varianza de dos factores, el cual, permitirá obtener la condición óptima para el muestreo de aguas en la determinación de los HAP empleando DMS, así como también determinar las variables que afectan el procedimiento de muestreo.

## 2.8 ANTECEDENTES

A continuación se hace referencia a una variedad de trabajos realizados a nivel nacional e internacional, basados en el estudio de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, que han sido considerados para sustentar la información presentada en esta investigación.

**Huckins *et al.* (1992).** Llevaron a cabo un estudio fundamentado en la recuperación, limpieza y cuantificación de muestras de agua contaminadas con HAP, el muestreo se realizó empleando DMS con el fin de imitar el proceso de bioconcentración en animales acuáticos que anteriormente eran utilizados para dicho análisis. El experimento se llevó a cabo con muestras tomadas de un estanque de control perteneciente al Centro Nacional de Investigación Pesquera de Contaminantes (NFCRC, por sus siglas en inglés) ubicado en Missouri, Estados Unidos. Los DMS fueron confeccionados con tubos de polietileno de baja densidad rellenos con trioleína al 99 % de pureza como fase secuestrante. La exposición de los DMS fue de 21 días y la recuperación de los analitos luego de 24 horas se realizó con diálisis en una mezcla de solventes orgánicos

(diclorometano-hexano en proporción media de 7:93, v/v). Obtuvieron el límite de cuantificación en aproximadamente 50 ng/g. La determinación de los analitos fue por cromatografía de gases con detector de fotoionización y para su cuantificación emplearon acoplamiento con espectrometría de masas comparando los espectros de masas con el de la base de datos correspondiente. En este estudio se obtuvo una reproducibilidad aparente en la absorción de los HAP en DMS, concluyeron que estos dispositivos son muy útiles para la determinación el nivel de contaminación por HAP en medios acuáticos donde las condiciones de temperatura se mantienen constantes, esto quiere decir, que los DMS son una alternativa para detectar la presencia de compuestos orgánicos aunque se encuentren a bajas concentraciones <sup>[1]</sup>.

**Angulo (2000).** Realizó un estudio comparativo de la capacidad secuestrante de compuestos orgánicos entre diversos DMS, como lo son los de membrana de polietileno de baja densidad (PEBD) con un espesor de 20  $\mu\text{m}$  y membranas de celulosa regenerada empleando hexano, trioleína y aceites naturales (maíz, oliva y ricino) como fase secuestrante. Los contaminantes estudiados fueron preparados como una solución de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (antraceno, fenantreno y naftaleno), pesticidas clorados (aldrin, DDT, dieldrin, endrin y lindano) y fenoles clorados (2,3-diclorofenol; 3,4-diclorofenol y 2, 4, 6-triclorofenol), en agua de mar; los períodos de exposición se extendieron hasta 96 horas. La determinación de estos compuestos se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los resultados indicaron que el DMS más efectivo para acumular los contaminantes fue el de polietileno/hexano, aun cuando presentó una escasa reproducibilidad debido a la alta fugacidad del hexano, el cual fue el solvente empleado. Así mismo, encontró que los DMS de polietileno/aceites naturales presentaron un comportamiento similar al de polietileno/trioleína, ya que, a las 48 horas de exposición indicaron concentraciones similares: 310 mg/L, 294 mg/L, 220mg/L y 234mg/L para los dispositivos rellenos de aceite de maíz, trioleína, aceite de oliva y de ricino

respectivamente. Por esta razón, concluyó que el uso de aceites naturales como fase secuestrante de los contaminantes orgánicos constituye una herramienta de menor costo y puede proyectarse como sustitutos de la trioleína. En el trabajo se recomienda emplear películas poliméricas de mayor grosor como las de 40  $\mu\text{m}$  para reducir la fugacidad del solvente empleado como fase secuestrante. Este antecedente ha sido el único encontrado a nivel nacional para el momento de desarrollar este trabajo de investigación en materia del uso de DMS en Venezuela <sup>[3]</sup>.

**Díaz et al. (2001).** Desarrollaron un método de análisis para cuantificar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en agua potable a concentraciones por debajo de los límites máximos permitidos según la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua, realizado en México. Para la cuantificación de los poliaromáticos fue empleado el método de estándar interno, el procedimiento consistió en preparar soluciones primarias de 16 HAP a partir de estándares certificados. El proceso de extracción se realizó mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) usando discos y tubos SPE. El análisis instrumental fue realizado mediante la técnica de cromatografía de gases capilar con detector por espectrometría de masas (CGC-EM). Entre sus resultados más destacados, obtuvieron los cromatogramas que mostraron la separación de los poliaromáticos mediante los tiempos de retención para cada compuesto, así mismo, los espectros de masas de cada analito se compararon con los de la base de datos para su identificación. Fue determinado el coeficiente de varianza (% CV) con valores entre 1 y 11 %, además, el límite de cuantificación más bajo fue para el benzo(k)fluoranteno de 0,78 mg/L y el más alto para el benzo(a)pireno con un valor de 10,39 mg/L. El límite de detección fue reportado en un intervalo de 0,26 – 3,46 mg/L. En cuanto a los valores encontrados de concentración para los 16 HAP analizados se encontraron entre 5 y 25 mg/L. A pesar de ser un método en el cual se obtienen resultados satisfactorios, desde el punto de vista instrumental presenta una gran desventaja, ya que, el análisis de contaminantes orgánicos a niveles trazas

requiere el empleo de instrumentación analítica avanzada y muy costosa, sin embargo, es una importante contribución al análisis de HAP en muestras de agua potable, directamente relacionada con el consumo humano <sup>[36]</sup>.

**Mei Ma *et al.* (2005).** Realizaron un estudio cuyo objetivo principal fue comparar las técnicas de muestreo de dispositivos de membranas semipermeables (DMS) y micro extracción el fase sólida (MEFS), con la finalidad de evaluar el riesgo ecológico potencial provocado por los contaminantes orgánicos hidrófobos en el río Huaihe, China. Los DMS que se utilizaron para este trabajo de investigación fueron tubos de polietileno de baja densidad rellenos con trioleína como fase secuestrante, el mismo tipo de dispositivos empleado por Huckins *et al.* en el año 1992. La investigación señala que luego de la exposición por 28 días, los DMS fueron tratados con ciclohexano como disolvente para llevar a cabo la diálisis a 13°C durante 24 horas en ausencia de luz. Los dializados fueron purificados empleando la técnica de cromatografía en columna. El análisis de bifenilos policlorados (PCBs por sus siglas en inglés) se llevó a cabo mediante la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y para la determinación de los 16 HAP se empleó la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés). De igual manera, indicaron en sus resultados que los componentes de toxicidad aguda fueron bencenos sustituidos tales como: clorobenceno, anilina, bencenos y nitrobenceno. Así mismo, reportaron concentraciones de HAP totales entre 2652,6 y 3592,1 µg/Kg para los sitios más contaminados del sitio de muestreo. Entre las conclusiones de este trabajo se destaca que el empleo de las técnicas de DMS y EFS es comparable debido a que, se obtuvieron concentraciones similares de los compuestos orgánicos determinados <sup>[27]</sup>.

**Bustamante et al. (2013).** Desarrollaron un estudio con la finalidad de demostrar la eficacia en la extracción de compuestos orgánicos mediante la técnica por ultrasonido. El trabajo de investigación se llevó a cabo en el departamento de Química Analítica de la Universidad del País Vasco, España, basado en la comparación entre las técnicas de extracción: diálisis asistida por ultrasonido y diálisis con solvente orgánico (UAD y OSD respectivamente por sus siglas en inglés). El método propuesto implicó una buena capacidad de recuperación de los compuestos orgánicos contenidos en los DMS (en torno al 100% para cada analito). El DMS empleado consistió en un tubo de polietileno de baja densidad relleno con trioleína como fase secuestrante de un 95 % de pureza. Fue colocado en un matraz de vidrio con 80 mL de hexano y sometido a ultrasonido por 32 minutos. Esta configuración es capaz de extraer simultáneamente hasta ocho muestras. El tiempo de extracción fue optimizado mediante una serie de ensayos previos colocando el baño de ultrasonido a diferentes tiempos que fueron de 8 a 80 minutos, encontrando que 32 minutos era el tiempo suficiente para realizar la extracción de todos los analitos presentes en la membrana. Entre de sus conclusiones señala, que los resultados con la metodología de ultrasonido son comparables a los obtenidos con la diálisis en un solvente orgánico, contribuyendo así con el estudio de la química verde disminuyendo las cantidades de solventes empleados en la extracción <sup>[26]</sup>.

**Karacik et al. (2013).** Realizaron un estudio, con la finalidad de estimar las concentraciones de hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP), bifenilos policlorados (BFPC) y plaguicidas organoclorados (POC) a partir de la exposición de DMS en aguas del Estrecho de Estambul y al Mar Mármara, Turquía. Los DMS consistieron en tubos de PEBD empleando la trioleína al 95 % de pureza como fase secuestrante, los cuales fueron recuperados luego de 7 y 21 días de exposición. De igual manera, los dispositivos se trasladaron al laboratorio de análisis para realizar la extracción mediante un proceso de diálisis, para lo cual, se colocaron los dispositivos en 100 mL de ciclohexano y en agitación constante a 200 rpm durante toda la noche. Luego, los

extractos fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y los criterios de cuantificación empleados incluyeron la confirmación de los tiempos de retención y las relaciones isotópicas de las normas de etiquetado de los respectivos analitos. Entre sus resultados destacan, que las concentraciones de HAP totales en agua se encuentran entre 13 y 79 ng/L y entre 7 y 68 ng/L durante 7 y 21 días de exposición respectivamente. Es un estudio reciente, que permite justificar el uso de DMS como una herramienta accesible y con resultados satisfactorios en el análisis de contaminantes orgánicos en cuerpos de agua <sup>[40]</sup>.

**Vrana et al. (2014).** Llevaron a cabo el análisis para la determinación de la concentración de contaminantes orgánicos como HAP, bifenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés); así como de metales pesados en el río Danubio, ubicado entre las ciudades de Viena y Bratislava, Europa Central. En su investigación, aplicaron DMS de polietileno de baja densidad y trioleína como fase secuestrante como sistema de muestreo, los cuales fueron colocados en varias zonas del río durante 14 días, y luego de ser expuestos, los contaminantes fueron tratados con hexano para llevar a cabo la diálisis por 24 horas y la limpieza del extracto orgánico se realizó por cromatografía de columna. Finalmente, se caracterizaron los contaminantes por la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). Entre sus resultados destacan que la concentración promedio de HAP analizando los DMS expuestos oscilaba entre 5 y 72 ng/L. Los investigadores indican que este trabajo proporciona una variabilidad temporal y espacial de las concentraciones biodisponibles de los contaminantes considerados como prioritarios en un tramo seleccionado del río Danubio, un río importante del continente europeo. Es uno de los estudios más recientes que se conoce hasta el momento donde se emplea DMS para determinar las concentraciones de contaminantes en sistemas acuáticos y así comparar los datos de monitoreo obtenidos en diferentes lugares y épocas del año, lo que hace que los

muestreadores pasivos sean una herramienta muy útil que proporciona resultados satisfactorios en el análisis <sup>[41]</sup>.

A partir de la revisión bibliográfica presentada y tomando en cuenta la poca información que se maneja hasta el momento sobre el estudio de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua, se plantean a continuación los siguientes objetivos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Optimizar el muestreo de aguas empleando la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

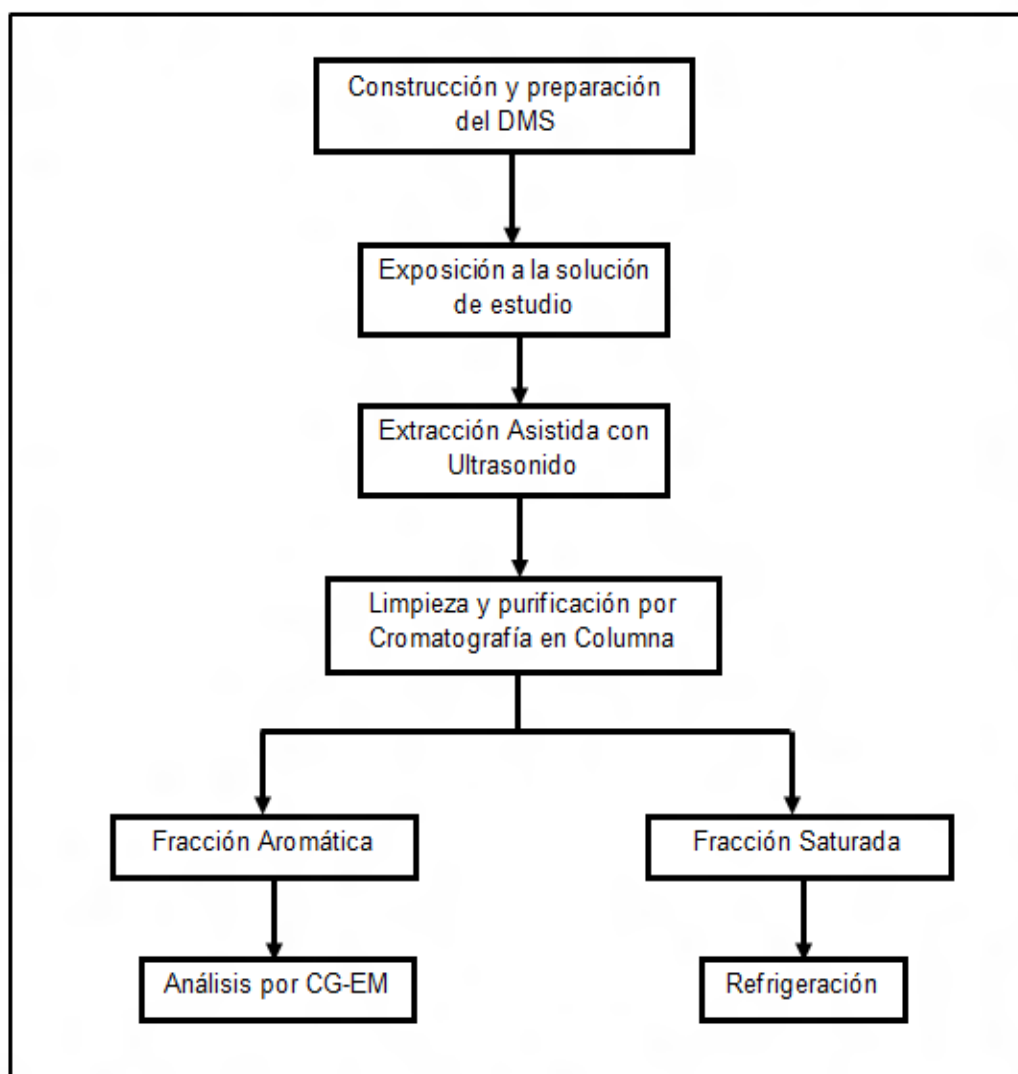
3.2.1 Construir un dispositivo de membrana semipermeable con implementos nacionales para llevar a cabo el muestreo de aguas.

3.2.2 Optimizar los parámetros: tiempo de exposición y agitación en el muestreo de aguas empleando la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS).

3.2.3 Comprobar la extracción de los HAP estudiados determinándolos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación se describe la metodología empleada para llevar a cabo los objetivos propuestos, en la figura 5 se muestra el esquema metodológico general.



**Figura 5.** Esquema general de la metodología experimental empleada.

## 4.1 CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE

El Dispositivo de Membrana Semipermeable (DMS) fue elaborado siguiendo el diseño propuesto por Huckins *et al.* en el año 2006 <sup>[21]</sup>, (ver figura 4). Con la idea de elaborar un dispositivo que cumpliera con las mismas características a este modelo, se utilizaron materiales accesibles y de menor costo con la finalidad de desarrollar en nuestro país, un DMS para muestrear compuestos orgánicos en ambientes acuáticos. De forma general, los materiales empleados para la confección del dispositivo de membrana semipermeable fueron los siguientes: láminas de acrílico transparente, tornillos de acero inoxidable, resortes, tubo sólido de aluminio, tuercas con rosca, ganchos en forma de percha y un envase de un polímero resistente. La construcción del dispositivo para este trabajo de investigación se realizó en el taller mecánico de Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

### 4.1.1 Relleno de la membrana semipermeable

La membrana semipermeable consistió en un material de polietileno de baja densidad (PEBD), para ello, se cortaron bolsas con cierre tipo clic constituidas de este material y se unieron con una máquina selladora de plástico hasta alcanzar las dimensiones establecidas de 91,4 cm de largo y un ancho de 2,5 cm <sup>[21]</sup>. Para el relleno de la membrana se empleó como fase secuestrante aceite de soya de una marca comercial con el objetivo de evaluar la capacidad de adsorción de los contaminantes orgánicos en su superficie, tomando como referencia el trabajo de Angulo en el año 2000 <sup>[3]</sup>. Luego de ser cortadas, cada una de las membranas fueron cerradas en uno de sus extremos con el sellador de plástico a base de calor (ver figura 6) y por el extremo abierto se añadió el peso equivalente a 1 mL de aceite de soya ( $G_e=0,924$ ), los pesos agregados

a cada una de las membranas se muestran en la tabla 4. Luego se retiró todo el aire de la membrana de forma manual tratando de esparcir el aceite a lo largo de esta membrana <sup>[41]</sup>. Finalmente, las membranas fueron colocadas sobre papel absorbente para comprobar el sellado y que la fase secuestrante no se perdiera. En la manipulación de la membrana se utilizaron guantes y se tomaron todas las previsiones de limpieza para evitar en todo momento la contaminación de la muestra.



**Figura 6.** (A) Sellado de la membrana semipermeable; (B) Membranas rellenas con aceite de soya y selladas en ambos extremos.

**Tabla 4.** Pesos del aceite agregado a cada membrana semipermeable.

<b>Membrana</b>	<b>gramos de aceite (<math>\pm 0,0001</math>)g</b>
1	1,3511
2	1,3671
3	1,4578
4	1,3723
5	1,3944
6	1,3664
7	1,4051
8	1,2614
9	1,3671
10	1,2724
11	1,5231
12	1,5119

## 4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental planteado en esta investigación consistió en un análisis de varianza con dos factores, en el cual, se evaluaron los siguientes factores: tiempo de exposición de la membrana y agitación, así mismo, se establecieron dos niveles de factores para cada variable considerando 8 horas, como el tiempo mínimo y 48 horas como el tiempo máximo estimado para la exposición del DMS en campo. De igual

manera, en la agitación se consideraron dos valores extremos: uno sin agitación y otro con una velocidad de agitación fija para todos los experimentos. Con la finalidad de determinar la condición óptima que permitiera obtener la mayor adsorción de los compuestos orgánicos objeto de estudio, se compararon los gramos de fracción aromática extraída por mililitro (mL) de aceite en cada ensayo. Cada condición de tiempo y agitación fueron combinadas de manera que se obtuvo una matriz con cuatro (4) posibilidades de exponer la membrana, cada una se realizó por triplicado dando lugar a doce (12) ensayos en total, así mismo, se realizó el blanco con la condición máxima de muestreo, es decir, 48 horas con agitación. Cabe destacar que, los ensayos se realizaron sin el DMS, debido a que éste no fue considerado una variable en el proceso de optimización, empleando en su lugar cilindros graduados de 1000 mL. En la tabla 5 se pueden observar los factores y niveles considerados, así como también la respuesta a obtener del diseño experimental.

**Tabla 5.** Factores, niveles y respuesta de los experimentos a realizar según el diseño experimental.

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>	<b>Respuesta</b>
Tiempo (horas)	8	g de F.H.A / mL de aceite
	48	
Agitación	S/A	
	C/A	

S/A: Sin Agitación      C/A: Con Agitación  
 F.H.A: Fracción de Hidrocarburos Aromáticos

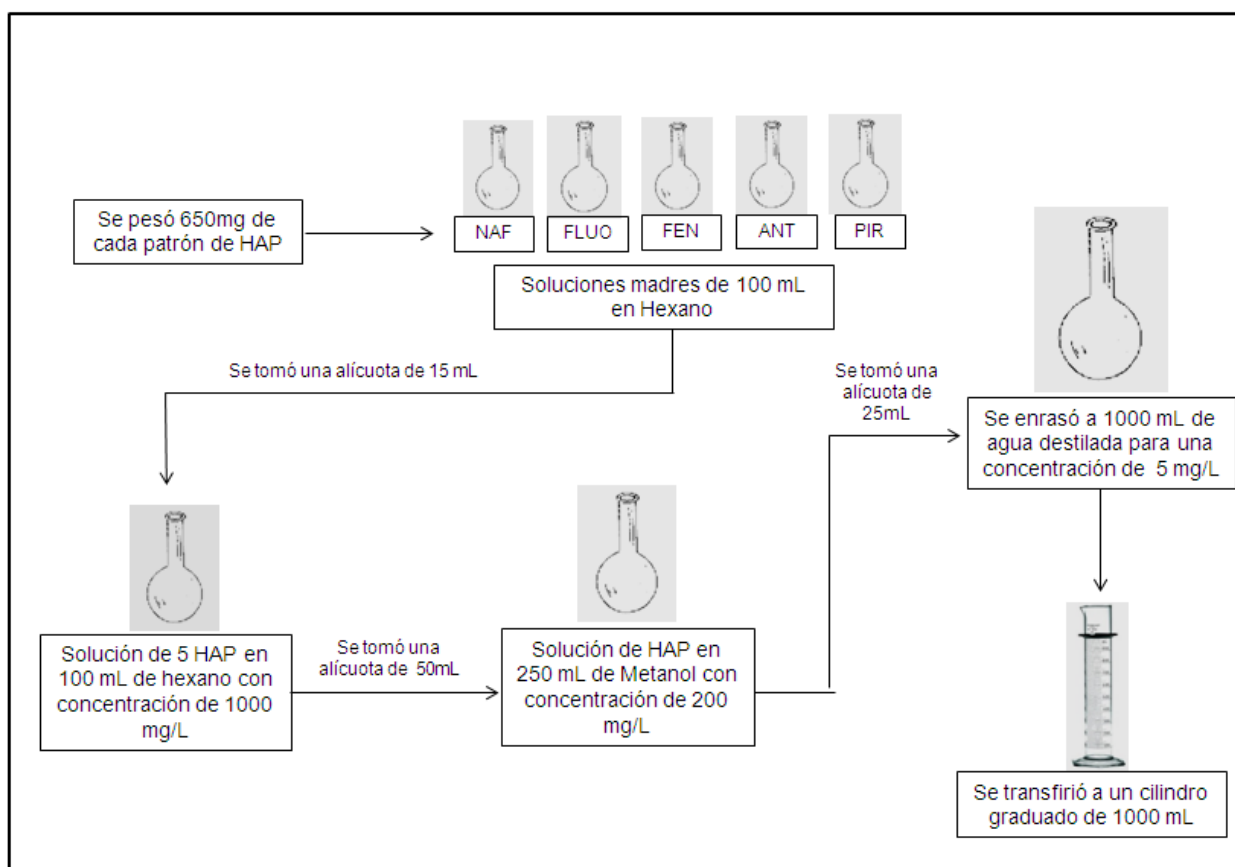
#### **4.2.1 Pruebas de solubilidad aplicadas a los patrones puros de HAP**

Para las muestras sintéticas preparadas en el laboratorio fueron empleados patrones puros de cinco de los 16 HAP considerados como prioritarios por la EPA-USA de bajo peso molecular (naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno) y mediano peso molecular (pireno) <sup>[11]</sup>. La selección de sólo cinco HAP, se debió a la disponibilidad de estos compuestos para el momento del desarrollo del presente trabajo de investigación, ya que, era necesario contar con patrones certificados para la validación de la metodología planteada. Se determinó la relación de solubilidad en la combinación de tres solventes, hexano, metanol y agua, con la finalidad de obtener una solución acuosa completamente homogénea y estable en el tiempo.

#### **4.2.2 Preparación de la solución de estudio**

Una vez conocida la solubilidad de los patrones y establecida la relación mínima de los solventes hexano: metanol, la cual, fue de 1: 5 v/v y hexano-metanol: agua, que fue de 1:40 v/v, se preparó la solución de estudio de la siguiente manera: inicialmente se preparó 100 mL de solución madre de cada compuesto por separado en hexano, cuya concentración era de 6500 mg/L. Seguidamente, se tomó una alícuota de 15 mL de cada solución madre y se agregaron en un balón aforado de 100 mL, con la finalidad de tener los poliaromáticos en estudio en una misma solución. La concentración en esta dilución fue de 1000 mg/L. Cabe destacar que para lograr una completa disolución de los compuestos sólidos en hexano, cada solución madre fue sometida a un baño de ultrasonido durante 20 minutos. Posteriormente, se tomó una alícuota de 50 mL de esta solución y se enrasó a 250 mL con metanol, previa agitación hasta obtener una sola fase. La concentración de HAP en esta solución fue de 200 mg/L. Finalmente, de ésta,

se tomó una alícuota de 25 mL y se enrasó a 1000 mL con agua destilada, donde la concentración final de cada HAP fue de 5 mg/L, dicha solución fue colocada en un agitador magnético hasta que fuera completamente homogénea y estable en el tiempo. Este procedimiento se realizó para todos los ensayos del diseño experimental y el blanco. Los valores exactos de concentración en cada solución se pueden observar en el apéndice 9.1. En la figura 7 se muestra un esquema general del procedimiento llevado a cabo en la preparación de la solución objeto de estudio.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento para preparar la solución de estudio.

### 4.2.3 Exposición de las membranas semipermeables

Las membranas fueron expuestas a la solución acuosa contenida dentro de cilindros graduados de 1000 mL, cada uno fue cubierto con papel de aluminio durante el tiempo de exposición y en los casos donde fue necesaria la agitación, se introdujo un agitador magnético y se colocó sobre una plancha de agitación manteniendo una velocidad constante y se trabajó a la temperatura del laboratorio, correspondiente a 24 °C (Ver figura 8). Cabe destacar, que todos los ensayos y réplicas correspondientes a las condiciones establecidas en el diseño experimental se realizaron de forma aleatoria.

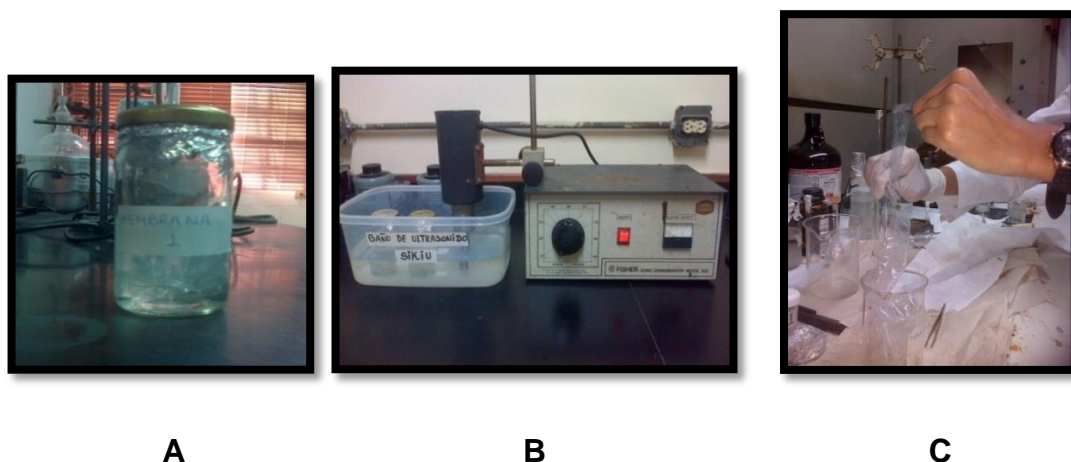


*Figura 8. Fotografía de los montajes de la exposición de las membranas a la solución de estudio.*

### 4.2.4 Extracción asistida por ultrasonido del extracto orgánico

Una vez cumplido el tiempo de exposición, las membranas fueron retiradas de la solución y secadas suavemente colocándolas sobre un papel absorbente. Luego, se

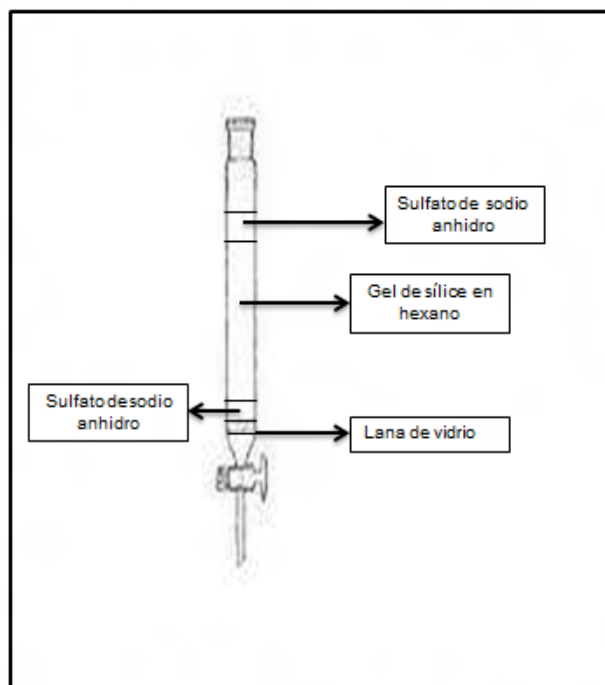
introdujeron en un recipiente de vidrio con 80 mL de hexano de manera de cubrir por completo las membranas, seguidamente, el recipiente se tapó colocando papel de aluminio y fueron sometidas a un baño de ultrasonido empleando el equipo *Sonic Dismembrator*, Modelo 300, Marca FISHER, por 32 minutos, tiempo en el cual se obtiene la mayor extracción de los analitos, tomando como referencia el trabajo realizado por Bustamante *et al.* en el año 2013 <sup>[26]</sup>; así mismo, la temperatura del baño correspondió a la temperatura del laboratorio, siendo monitoreada colocando un termómetro manteniéndose a 23 °C durante todo el procedimiento. Cumplido el tiempo, el extracto se agregó en un vaso de precipitado de 400 mL y utilizando dos varillas de vidrio se escurrió la membrana completamente para que no quedara restos de hexano (ver figura 9). Al vaso de precipitado fue agregada una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro para eliminar cualquier resto de agua que pudiera contener. Posteriormente, el extracto fue decantado a un balón de 100 mL y fue llevado a un rotavapor Modelo 803/804, marca Fisatom LTDA para reducir el volumen de solvente.



**Figura 9.** Procedimiento de extracción: (A) Membrana colocada en recipiente con 80 mL de hexano; (B) Muestras en el baño de ultrasonido; y (C) Limpieza de la membrana.

#### 4.2.5 Separación de la fracción de hidrocarburos aromáticos

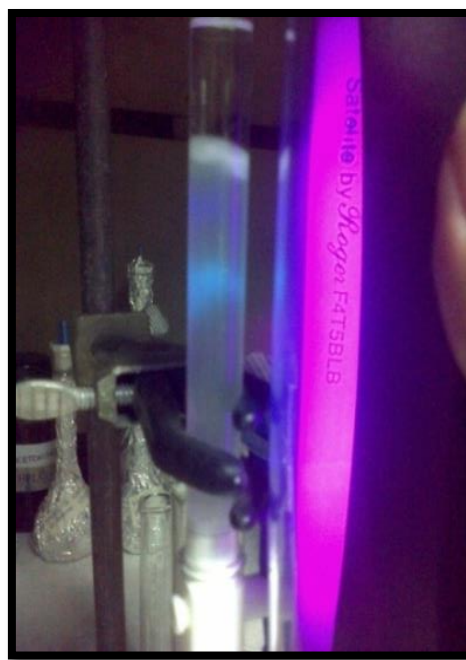
La limpieza y purificación del extracto orgánico fue realizada siguiendo el método 3630C de la EPA-USA empleando la técnica de cromatografía en columna (CC) <sup>[42]</sup>. En los primeros ensayos, la separación de la fracción aromática fue realizada con una microcolumna empleando para ello una pipeta Pasteur, debido a la poca cantidad de fracción orgánica obtenida. Sin embargo, al visualizar el cromatograma de dicha muestra, se observó una gran saturación por la presencia de los ácidos grasos correspondientes al aceite proveniente de la fase secuestrante (ver apéndice 9.2). Debido a esto, se dispuso una columna de vidrio con 12 cm de longitud y 1 cm de diámetro interno. Previo al empacado de la columna, la misma fue curada dos veces con 10 mL de hexano, lo que permitió verificar la ausencia de fugas. La columna fue empacada en el siguiente orden: en la parte inferior se colocó una pequeña cantidad de lana de vidrio de 0,5 cm aproximadamente para evitar el paso de la suspensión por la llave, seguido de una capa de sulfato de sodio anhidro de 1 cm de grosor previamente activado por 4 horas a 400 °C. Posteriormente, fueron añadidos unos 7 cm de suspensión de gel de sílice preparada en hexano previamente activada a 130 °C por 48 horas y finalmente, otra capa de 1 cm de grosor de sulfato sodio anhidro (ver figura 10).



**Figura 10.** Esquema del empackado de la columna cromatográfica.

Para el empackado de la columna y la transferencia de la suspensión, fueron empleadas pipetas Pasteur, y a medida que era agregada se le dieron golpes suaves a la columna para impedir la formación de burbujas. Seguidamente, se añadieron 2 mL del extracto orgánico reconstituidos en su respectivo solvente de origen (hexano). En muestras reales, para la elución de la fracción aromática, se emplea una mezcla de hexano: diclorometano en una relación 2:3 v/v <sup>[42]</sup>, sin embargo, debido a que la muestra de agua utilizada en el presente trabajo fue preparada en el laboratorio, conociendo que su contenido sólo era los HAP en estudio, se empleó una modificación eluyendo inicialmente con 20 mL de hexano para separar los compuestos saturados provenientes del aceite y luego con 40 mL de diclorometano para obtener la separación de los aromáticos, esto fue posible ya que, se conoce que los poliaromáticos se eluyen bien sólo con diclorometano en los casos donde la muestra contenga únicamente estos compuestos. Como los HAP tienen la propiedad de fluorecer se utilizó una lámpara de

radiación UV para visualizar su separación a lo largo de la columna (ver figura 11). Luego, las fracciones se concentraron en un rotavapor manteniendo constante la temperatura del baño de agua a 40°C. Las fracciones de hidrocarburos aromáticos fueron transferidas a viales previamente pesados y curados con pequeñas porciones de diclorometano, el solvente se dejó evaporar completamente en corriente de aire dentro de la campana de extracción. Luego, fue obtenido el peso correspondiente a cada una de las fracciones de hidrocarburos aromáticos del diseño experimental y finalmente se guardaron en refrigeración hasta el momento de ser analizadas.

**A****B**

**Figura 11.** Fotografías de las columnas cromatográficas: (A) Montaje simultáneo de tres columnas; (B) Separación de la fracción aromática vista con una lámpara UV.

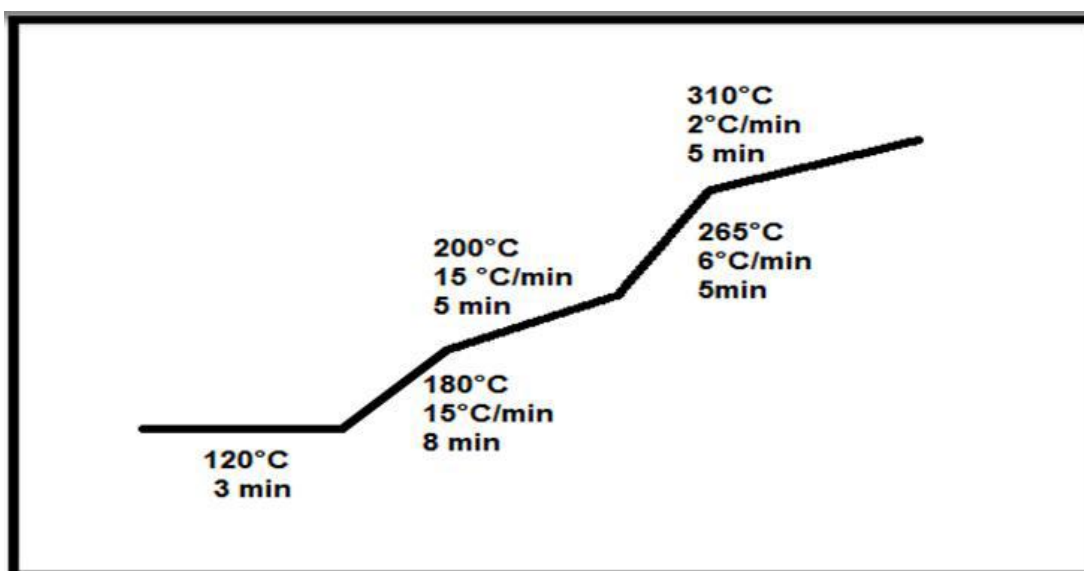
#### 4.2.6 Determinación de los HAP por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

A las fracciones de hidrocarburos aromáticos pesadas anteriormente se les agregó 1 mL de diclorometano grado HPLC y fueron transferidas a viales de 1,5 mL dispuestos para el análisis. Luego, las muestras fueron inyectadas en el Cromatógrafo de Gases del Instituto de Ciencias de la Tierra (ICT), modelo 6890N con Automuestreador 7683B ALS *Agilent Technologies Inc.* 2850 Centerville Road. Wilmington, DE. 19808-1610 USA, con detector de masas Agilent 5975 (ver apéndice 9.7), y se siguieron las condiciones cromatográficas que se muestran en la tabla 6 para la detección de los HAP.

**Tabla 6.** Condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de los HAP <sup>[43]</sup>.

<b>Gas de arrastre</b>	Helio (He)
<b>Flujo del gas</b>	Constante a 1 mL / min
<b>Columna capilar</b>	Modelo J&W Scie 1225562 DB-5ms
<b>Temperatura máxima de la columna</b>	310°C
<b>Temperatura de inyección</b>	290°C
<b>Temperatura inicial de la columna</b>	120°C
<b>Volumen de inyección</b>	1µL
<b>Tiempo total de análisis</b>	64,67 minutos

La temperatura inicial de la columna fue de 120°C durante 3 minutos, seguido de una tasa de calentamiento de 15°C/min hasta alcanzar una temperatura de 180°C, en la cual estuvo por 8 minutos, luego a razón de 15°C/min hasta 200°C por 5 minutos, para continuar con una tasa de 6°C/min hasta llegar a 265°C por 5 min, para finalmente aumentar la temperatura a una tasa de 2°C/min hasta alcanzar los 310°C, temperatura a la cual se mantiene por 5 minutos para un tiempo de análisis total de 64,67 minutos. [43]. Las especificaciones de la columna empleada para el análisis se pueden observar en el apéndice 9.8. Así mismo, la rampa de calentamiento puede observarse en la figura 12.



**Figura 12.** Rampa de calentamiento utilizada en la separación de los HAP en el análisis por CG-EM [43].

Inicialmente, se realizó el análisis cromatográfico de una solución patrón preparada en acetonitrilo con una concentración de 0,2975 mg/L de cada uno de los HAP evaluados, con la finalidad de determinar los tiempos de retención de los compuestos estudiados. Luego, se analizaron las doce fracciones aromáticas y el blanco, cuyos tiempos de retención fueron comparados con el patrón para determinar cualitativamente, los HAP presentes en cada una de las muestras. Para la identificación de los compuestos, fue seleccionado el sistema de monitoreo de ion selectivo (SIM por sus siglas en inglés), empleando las masas características de cada uno de los compuestos. De esta manera, sólo un pequeño número de iones son monitoreados y la adquisición de los datos para la detección de los compuestos es rápida. La identificación de los analitos se realiza en base a la relación de masas entre el primer ion (ion cuantificador) y el segundo (ion de confirmación), la tabla 7 muestra los iones correspondientes a los compuestos estudiados.

**Tabla 7.** Iones de cuantificación y confirmación utilizados en el análisis de HAP por CG-EM<sup>[44]</sup>.

<b>Compuesto</b>	<b>Ion cuantificador</b>	<b>Ion de confirmación</b>
Naftaleno	128	127
Antraceno	178	176
Fluoreno	166	165
Fenantreno	178	176
Pireno	202	101

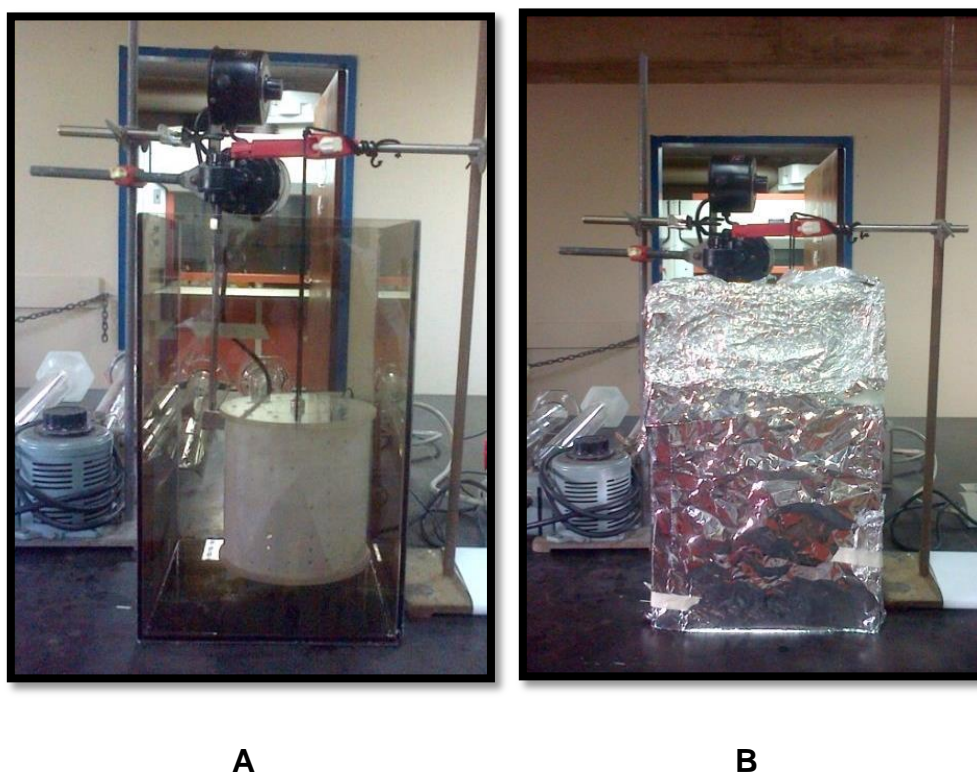
#### **4.2.7 Tratamiento estadístico mediante el análisis de varianza (ANOVA) con dos factores**

Cuando los resultados de un experimento son afectados por dos factores, como es el caso de la presente investigación, se debe emplear un análisis de varianza con dos factores para evaluar sus efectos. Los datos tomados para llevar a cabo el tratamiento estadístico en este diseño experimental fueron los gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos por mL de aceite. Así mismo, fue necesario evaluar el cumplimiento de ciertos supuestos en los que se basa el modelo estadístico, entre los que se encuentra que las poblaciones en estudio deben tener varianzas iguales. En tal sentido, antes de aplicar el análisis se aplicó una prueba a priori conocida como estadístico de Levene, el cual, contempla que: si el valor de probabilidad (**p**) se encuentra por encima del nivel de significancia establecido como  $\alpha=0,05$ ; se considera que hay homogeneidad entre las varianzas, y por lo tanto, el ANOVA puede ejecutarse <sup>[40]</sup>, (ver apéndice 9.3). Luego de verificar que las varianzas eran iguales se realizó el análisis de los datos según el modelo estadístico.

#### **4.3 EXPOSICIÓN DEL DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE**

Una vez establecida la condición óptima de muestreo, el DMS construido fue expuesto en 15 L de una solución acuosa con los cinco HAP estudiados, por un tiempo de 8 horas, cuya concentración de cada uno de los HAP fue de 0,5 mg/L. Esta concentración se estableció luego de evaluar los cromatogramas obtenidos de las muestras del diseño experimental, ya que, era necesario disminuir la concentración de los poliaromáticos en la solución, para exponer el dispositivo a las concentraciones más próximas a las encontradas en aguas de río. Se utilizó un recipiente de vidrio de 25 cm de ancho por

40 cm de largo. El DMS se mantuvo suspendido dentro del recipiente, de manera que no tocara las paredes del recipiente, fue colocado un agitador a velocidad constante y todo el sistema se cubrió con papel de aluminio para evitar la fotólisis de los analitos. Una vez cumplido el tiempo de exposición, el dispositivo fue retirado de la solución, se desmontó y luego se siguió el procedimiento descrito anteriormente para el tratamiento de las membranas, extracción y separación de la fracción aromática.



**Figura 13.** Fotografías del dispositivo colocado a la condición óptima de muestreo: (A) DMS suspendido en el recipiente de vidrio; (B) Sistema cubierto con papel de aluminio para evitar la fotólisis de los HAP.

## 5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

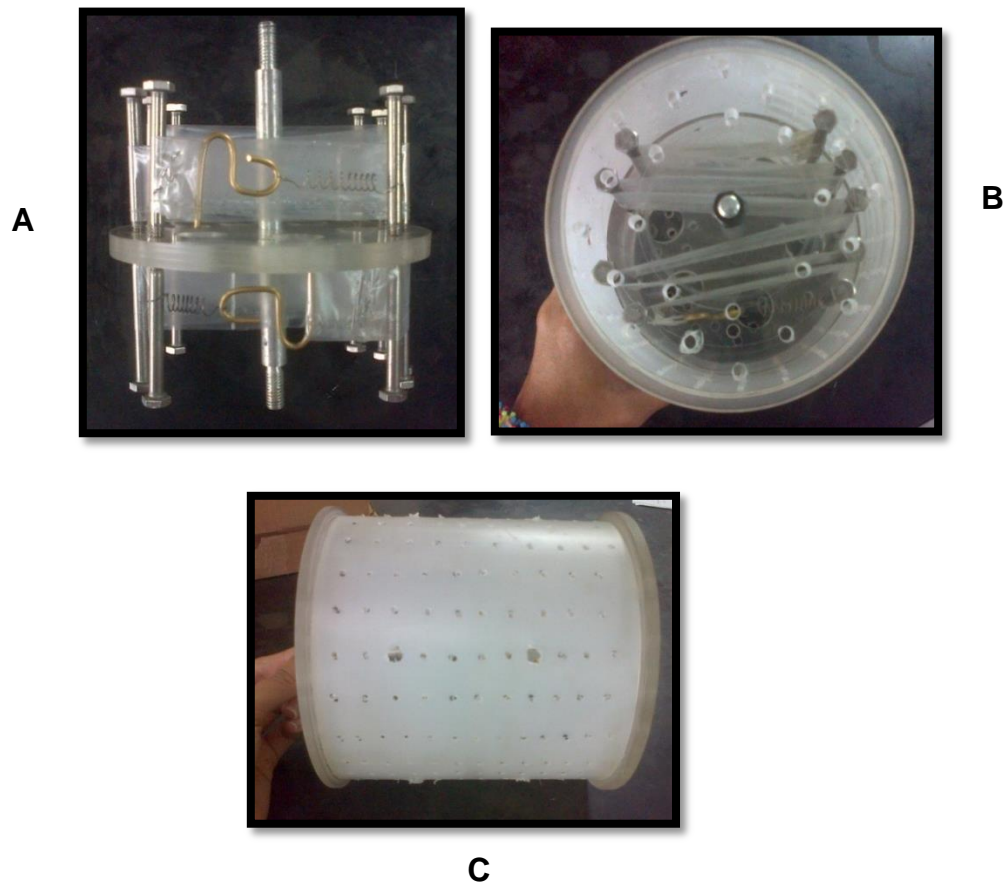
En este apartado se presenta el análisis de los resultados obtenidos en la extracción e identificación de los hidrocarburos Aromáticos Policíclicos evaluados (naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno) mediante la técnica de Dispositivo de Membrana Semipermeable.

### 5.1 CONFECCIÓN DEL DISPOSITIVO DE MEMBRANA SEMIPERMEABLE

La construcción del DMS se realizó como se describió en la sección 4.1 empleando materiales de fácil adquisición y de bajo costo. A pesar de utilizar otro tipo de materiales para su elaboración, de acuerdo al modelo de Huckins *et al.* en el año 2006 <sup>[21]</sup>, se trató de reproducir las condiciones necesarias para el buen funcionamiento del dispositivo, y para ello, se utilizaron los siguientes materiales:

- Tres (3) láminas de acrílico transparente de un centímetro (1cm) de grosor.
- Dieciocho (18) tornillos de acero inoxidable de 3 pulgadas (7,6 cm) de largo y ¼ pulgada (0,6 cm) de diámetro, con cabeza hexagonal colocados en la parte superior e inferior del soporte.
- Dos (2) membranas semipermeables de polietileno de baja densidad (PBD) de 91,4 cm de largo y 2,5 cm de ancho <sup>[21]</sup>.
- Dos (2) resortes de aluminio de 3 cm de longitud.

- Dos (2) ganchos en forma de percha para sostener y tensar las membranas en el soporte.
- Un tubo sólido de aluminio de 12 cm de longitud y dos tuercas colocadas en cada extremo para fijar el DMS.
- Una canasta protectora de 15 cm de alto por 13 cm de ancho, elaborada con un recipiente de plástico de polietileno tereftalato cortado y perforado.

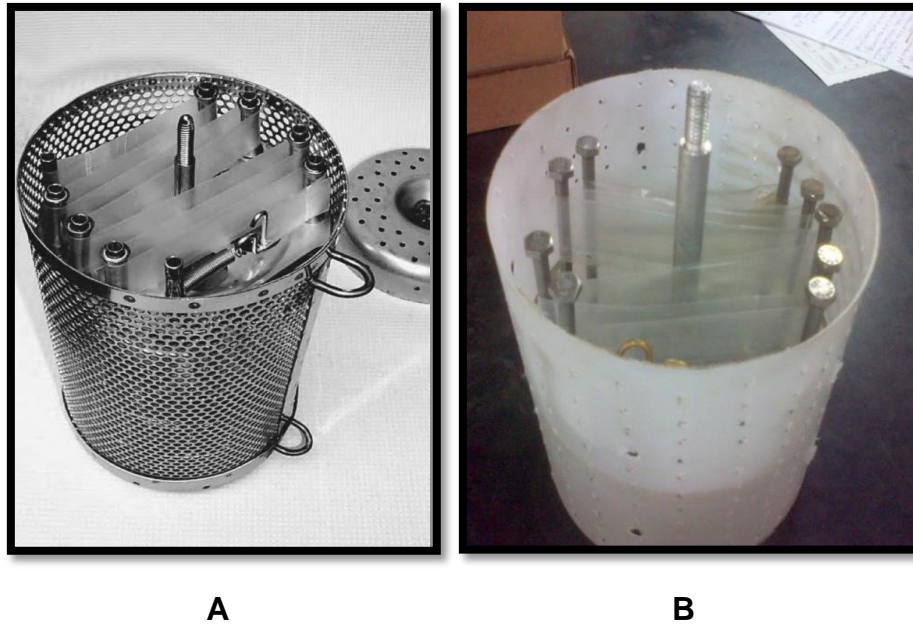


**Figura 14.** Fotografías del DMS elaborado A) Disposición de las dos membranas semipermeables en un soporte de acrílico; B) Colocación de la tapa; C) Canasta protectora de plástico.

El modelo diseñado por Huckins *et al.* en el año 2006, cada soporte posee una membrana semipermeable (ver figura 4), sin embargo, el DMS construido para el presente trabajo de investigación consta de dos membranas colocadas en la parte superior e inferior de un mismo soporte (ver figura 14A). Además, con la intención de realizar estudios posteriores a esta investigación y llevar el sistema a campo, colocar dos membranas permite un ahorro en material, además de lograr una mayor adsorción de los compuestos orgánicos en el tiempo que dure la exposición del DMS. Entre las características del dispositivo se pueden destacar: tiene forma cilíndrica, un peso total de  $(1112,7 \pm 0,1)$  g y un área total de  $12,7 \text{ m}^2$ . El posicionamiento del dispositivo dentro de la canasta protectora evita que la membrana se golpee con las paredes de dicho recipiente.

El dispositivo fue elaborado con materiales de fácil adquisición y bajo costo, en comparación con el propuesto por Huckins *et al.* en el año 2006 <sup>[21]</sup>, cuyas piezas, en su mayoría, son de acero inoxidable. La razón principal del uso de materiales alternativos se debe al elevado costo y poca disponibilidad en el mercado de piezas en acero inoxidable. Las láminas de material acrílico fueron seleccionadas debido a que este tipo de plástico es un polímero del metil metacrilato conocido también como PMMA, el cual, es inerte a muchas sustancias químicas, incluyendo soluciones de álcalis y ácidos como el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e hidrocarburos alifáticos como el hexano, pentano, octano, entre otros. Su resistencia a la intemperie hace que sea el material idóneo para una variedad de aplicaciones al aire libre <sup>[45]</sup>. Debido a esto, se consideró un material adecuado para sustituir las láminas de acero inoxidable del soporte del DMS, siendo éste, de fácil acceso en el mercado y menor costo. Por otro lado, fue necesario emplear un tubo sólido de aluminio como eje para fijar el DMS, debido a que al momento de ser confeccionado el dispositivo no se disponía de otro material lo suficientemente resistente a la oxidación en el tiempo, como el acero inoxidable. Sin embargo, por el poco tiempo que duró la exposición del DMS en el agua,

las piezas de aluminio utilizadas no se oxidaron, por lo que se infiere que no se vio afectado el proceso de adsorción de los HAP sobre la membrana. El plástico de la canasta, cuya función es la de proteger el DMS de golpes y del deterioro por cualquier agente externo, consta de un polímero de tereftalato de polietileno, el cual, es un tipo de plástico usado en envases de bebidas y alimentos, posee una alta resistencia química y a la corrosión, además, presenta una alta estabilidad a la intemperie y no es biodegradable <sup>[46]</sup>. Con estas características fue considerado un material adecuado para sustituir la malla de acero inoxidable del modelo DMS original, por un envase de iguales dimensiones para proteger el DMS (ver figura 15).



**Figura 15.** Comparación de dos DMS A) Modelo propuesto por Huckins et al. <sup>[21]</sup>; B) Diseño construido para el presente trabajo de investigación.

Un aspecto importante, y que justifica la razón por la cual se utilizaron materiales distintos al acero inoxidable para la construcción del DMS del presente trabajo de investigación lo constituye el elevado costo que implica adquirir un DMS suministrado por la principal compañía que se conoce hasta el momento a nivel internacional encargada de la venta y distribución de dispositivos de muestreo pasivo, como lo es, la empresa de Tecnologías en Muestreo Ambiental (*Environmental Sampling Technologies Inc.*, EST por sus siglas en inglés) <sup>[24]</sup>. En la tabla 8 se muestran los precios estimados tanto para el DMS construido en el presente trabajo como para el que se puede adquirir por la compañía antes mencionada.

**Tabla 8.** Precios estimados del DMS diseñado por Huckins *et al.* en el año 2006 <sup>[21]</sup>, y el confeccionado para la presente investigación.

<b>Materiales</b>	<b>Huckins <i>et al.</i> 2006 <sup>[21]</sup></b>	<b>La Riva 2015</b>
<b>Soporte y membrana semipermeable con la fase secuestrante + Canasta protectora</b>	Soporte, canasta en acero inoxidable y trioleína al 99 % de pureza	Soporte en acrílico, tornillos en acero inoxidable, aceite de soya comercial y envase de plástico de polietileno tereftalato resistente.
<b>Total Bs.</b>	340.000,00	15.000,00

### 5.1.1 Aceite de soya como fase secuestrante

En la mayoría de los estudios que se han realizado hasta el momento a nivel mundial, donde se emplean DMS como técnica de muestreo de compuestos orgánicos en ambientes acuáticos, se utiliza como fase secuestrante la trioleína, el cual, es un material lipídico formado principalmente por 60 % de ácido oleico y se utiliza por su afinidad con compuestos orgánicos no polares como los HAP <sup>[24]</sup>. En la tabla 9 se muestran los porcentajes de ácidos grasos de los aceites que pueden ser empleados en sustitución de la trioleína como fase secuestrante <sup>[47]</sup>, sin embargo, a pesar de que el aceite de oliva sería el más adecuado utilizar por su alto contenido en ácido oleico, no fue posible adquirirlo debido a su elevado costo. En función de estos porcentajes, se consideró el aceite de soya como el adecuado para emplearse en este estudio, por su alto contenido en ácido oleico en comparación con los otros aceites mostrados en la tabla 9, además, tomando como referencia el trabajo de Angulo en el año 2000 <sup>[3]</sup>.

**Tabla 9.** Porcentaje de ácidos grasos del aceite de soya, de girasol, maíz y oliva <sup>[47]</sup>.

<b>Aceite</b>	<b>Ácido oleico (%)</b>	<b>Ácido linoleico (%)</b>
Soya	(22 – 35)	(43 – 56)
Girasol	(14 – 25)	(44 – 75)
Maíz	(19 – 30)	(34 – 62)
Oliva	(65 – 80)	(4 – 10)

## 5.2 ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE MUESTREO SEGÚN EL DISEÑO EXPERIMENTAL

Considerando que en nuestro país, hasta donde se tiene conocimiento, no existen estudios que empleen DMS como técnica de muestreo en agua para analizar hidrocarburos aromáticos policíclicos, en este trabajo de investigación se realizaron los primeros ensayos con estos dispositivos para detectar estos compuestos, con el objetivo de que en estudios posteriores este sistema de muestreo se implemente en campo, y así, poder determinar el nivel de contaminación en cuerpos de aguas naturales como lagos o ríos. En tal sentido, fue utilizada una solución acuosa preparada en el laboratorio cuya concentración fue de 5 mg/L, a la que fueron incorporados los HAP en estudio: naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno. La concentración de los poliaromáticos en la solución se estableció como un valor fijo debido a que, ésta no fue considerada una variable en el proceso de optimización. Estudios recientes en aguas naturales indican que las concentraciones de HAP reportadas, empleando la misma técnica de análisis que se presenta en esta investigación, se encuentran en un rango de 7 y 79 ng/L (ppt) <sup>[40]</sup>. Sin embargo, los tiempos mínimos de muestreo en estos estudios son de semanas, por lo que, para ensayar muestreos cortos se consideró simular aguas con mayor concentración, con la finalidad de evaluar el rango de concentración mínimo en que pueden ser detectados con el DMS elaborado en este trabajo. Por esta razón, se realizó un primer ensayo, donde la concentración de los contaminantes en la solución fue de 10 µg/L (ppb), sin embargo, no fue posible la detección de los HAP debido a que, la intensidad de los picos cromatográficos era muy baja. En consecuencia, se aumentó la concentración hasta 5 mg/L, para garantizar la detección de los HAP por CG-EM, ya que, lo que se pretendía con esta investigación era optimizar las condiciones de muestreo para lograr determinar la presencia de estos compuestos en ambientes acuáticos con probabilidades de contaminación, en un tiempo de muestreo prudencial, por lo cual, cualquier concentración de trabajo era

posible, siempre y cuando se obtuvieran pesos considerables de fracción de hidrocarburos aromáticos donde el error o incertidumbre fuera mínimo.

Las condiciones establecidas de tiempo y agitación fueron seleccionadas considerando, en primer lugar, el tiempo al que se pudiera exponer el DMS en campo, es por ello, que se estableció 8 horas como el tiempo mínimo que dura una jornada de trabajo diaria, en la cual el DMS pudiera estar colocado en el agua y evitar ser objeto de robo o deterioro por el entorno y 48 horas como el tiempo máximo de exposición tomando como referencia el trabajo de Angulo en el año 2000 <sup>[3]</sup>. En cuanto a la agitación, se consideraron dos sistemas: uno simulando aguas tranquilas (sin agitación) y otra considerando aguas turbulentas (con agitación constante), esto con la finalidad de evaluar la influencia que tiene la agitación sobre la adsorción de los HAP en la membrana semipermeable. En tal sentido, los resultados obtenidos de los ensayos correspondientes al diseño experimental, se presentan en función de los gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos extraída por cada mL de aceite, además, a cada valor obtenido se le restó la fracción aromática correspondiente al blanco, cuyo peso fue de  $0,0012 \pm 0,0001$  g por mL de aceite (ver tabla 10).

**Tabla 10.** Gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos (F.H.A) extraída por mL de aceite para cada ensayo del diseño experimental y sus correspondientes figuras de mérito.

Muestra	Condición	gramos F.H.A extraída/mL aceite (g/mL)	Promedio (g/mL)	S	CV (%)
1	8h/S.A	0,017	0,016	0,002	12,6
4		0,014			
9		0,018			
2	8h/C.A	0,0137	0,014	0,0005	3,6
3		0,0146			
12		0,0144			
5	48h/S.A	0,012	0,012	0,002	16,7
7		0,011			
11		0,014			
10	48h / C.A	0,015	0,013	0,001	7,7
6		0,013			
8		0,012			

S.A: Sin Agitación    C.A: Con Agitación

S: Desviación Estándar    CV: Coeficiente de Variación

Los resultados indican que se extrajo cerca del 80% de fracción de hidrocarburos aromáticos en la condición de 8 horas sin agitación (ver apéndice 9.6). Considerando que las muestras sólo contenían los HAP como analitos, se puede inferir que los gramos obtenidos de cada ensayo corresponden a la cantidad de poliaromáticos que fueron retenidos en la membrana semipermeable. La obtención de una elevada

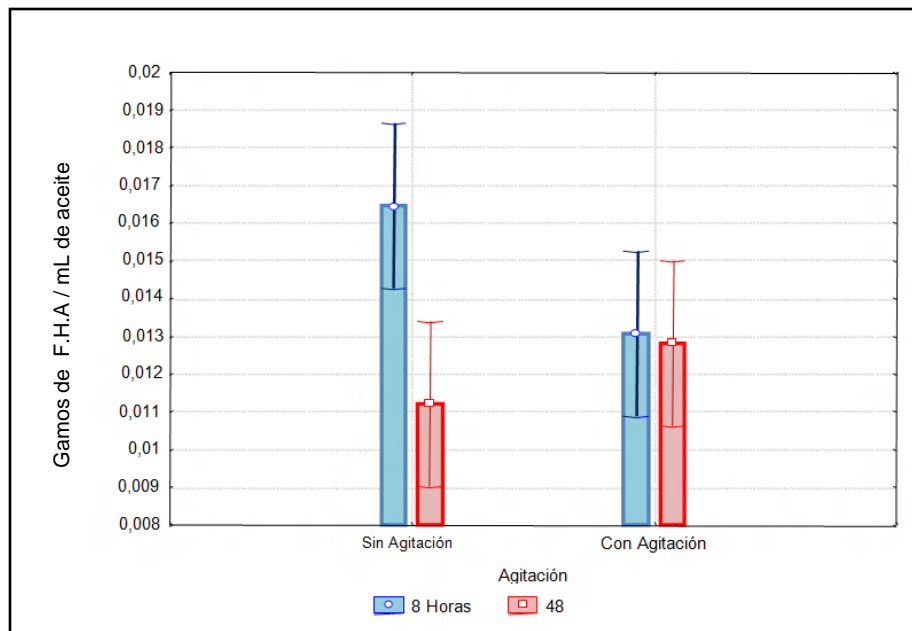
cantidad de fracción de aromáticos en el menor tiempo de exposición indica que posiblemente, las moléculas se estén sorbiendo en la superficie de la membrana semipermeable, ya que, al ser hidrofóbicas se ven atraídas por el polímero de la membrana, sin embargo, no hay tiempo suficiente para que se definan por una fase en particular y justamente la falta de agitación favorece que permanezcan allí adsorbidas, es por ello, que al retirar la membrana en 8 horas, se extrae todo lo que quedó adsorbido a ella. En el año 2001, Vrana *et al.* <sup>[48]</sup>, llevaron a cabo un estudio empleando DMS con membranas de polietileno de baja densidad, dentro de sus experimentos, realizaron un ensayo colocando la membrana vacía (sin trioleína), con la finalidad de determinar si el plástico puede adsorber los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Aunque en este trabajo no se indica con exactitud el tiempo de exposición de la membrana, los resultados muestran que, efectivamente el plástico puede retener sobre su superficie cierta cantidad de analito, ya que, en el análisis por CG-EM se identificaron naftaleno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno y criseno <sup>[48]</sup>. Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en la presente investigación, se realizó un ensayo adicional, colocando la membrana vacía (sin aceite) expuesta a la solución acuosa de concentración 5 mg/L obteniendo un porcentaje de recuperación de la fracción aromática de 3,7 % (ver apéndice 9.6). Lo antes expuesto, permite de alguna manera justificar el hecho de que a un tiempo de 8 horas y sin agitación se esté obteniendo una mayor cantidad de la fracción de hidrocarburos aromáticos. Por otro lado, cuando el sistema se encuentra en agitación se tiene una menor cantidad de F.H.A, lo cual, puede deberse a que en ese tiempo las moléculas tiendan a dispersarse un poco, sin embargo, aún siguen quedando adsorbidas en la membrana y por eso, la diferencia en gramos/ mL de aceite no es tan elevada.

Por otro lado, en el caso del sistema colocado a 48 horas, se observan valores cercanos entre los gramos de la F.H.A extraída con o sin agitación. De estos resultados se puede inferir que, un tiempo más largo permite que las moléculas alcancen el equilibrio de reparto y sean retenidas por el aceite a pesar de la agitación o no del sistema, sin embargo, parece ser que el hecho de que la membrana sea expuesta a un mayor tiempo provoca que las moléculas menos afines a esa fase secuestrante puedan volver a salir de la misma y quedar nuevamente en la solución <sup>[21]</sup>. Esto puede ocurrir, por ejemplo, para el naftaleno, el cual es uno de los poliaromáticos más solubles en agua y además presenta el menor valor del coeficiente de reparto octanol-agua de los compuestos estudiados, lo que quiere decir que su afinidad por el aceite es baja (ver tabla 1). Debido a esto, es posible suponer que inicialmente las moléculas no entraron a la membrana, sólo se adsorbieron a ella y luego, al transcurrir más tiempo se alcanzó el equilibrio, y por eso a 48 horas con o sin agitación no hay valores tan diferentes. De igual manera, los resultados del diseño experimental fueron analizados mediante un tratamiento estadístico, lo que permitió dar una mayor confiabilidad a los mismos.

### **5.3 RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL POR ANÁLISIS DE VARIANZA CON DOS FACTORES**

El análisis estadístico aplicado a los resultados obtenidos de las fracciones de hidrocarburos aromáticos extraídas de cada ensayo consistió en un análisis de varianza con dos factores, debido a que fueron evaluados el tiempo y la velocidad de agitación en la exposición de la membrana semipermeable a la solución de estudio. Los datos fueron analizados mediante el software estadístico StatSoft STATITICA versión 10.0 [programa de computadora] <sup>[49]</sup>. Este tratamiento estadístico constituye una herramienta muy útil, ya que, permite agrupar, comparar y clasificar de manera sencilla y práctica las variables que influyen en el comportamiento del conjunto de datos. El análisis de

varianza se utiliza para contrastar la hipótesis nula de que las medias son iguales. Además, es posible determinar si existen o no diferencias significativas entre dichas medias <sup>[50]</sup>. Cabe destacar que, el nivel de significancia del tratamiento estadístico aplicado es  $\alpha=0,05$ ; por lo tanto, si el valor de la probabilidad (**p**), del análisis de varianza está por debajo de este valor se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que existe al menos una diferencia significativa entre las medias de los factores en estudio <sup>[39]</sup>, estableciéndose por lo tanto, qué tan significativo es el efecto de un factor sobre la variable independiente, en este caso, sobre los gramos extraídos de la fracción de hidrocarburos aromáticos por mL de aceite. Estos análisis han sido un gran aporte en la realización del presente trabajo de investigación, al correlacionar los datos con un elevado nivel de confianza permitiendo así establecer la condición óptima de muestreo en agua para la determinación de HAP empleando la técnica de DMS <sup>[38]</sup>. En la figura 16 se muestra desde el punto de vista gráfico, los resultados de las medias e intervalos de confianza de los datos y en la tabla 11 se presentan los valores estadísticos obtenidos del ANOVA aplicado.



**Figura 16.** Gráfico de medias e intervalos de confianza para las condiciones establecidas en el diseño experimental <sup>[49]</sup>.

**Tabla 11.** Resultados estadísticos obtenidos del análisis de varianza con dos factores <sup>[49]</sup>.

<b>ANOVA</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Tiempo (1)	0,009	1	0,009	8,369	0,020
Agitación (2)	0,001	1	0,001	0,885	0,374
Interacción (1-2)	0,007	1	0,007	6,820	0,031
Error	0,009	8	0,001		

**F:** Valor estadístico de la prueba de Fisher

**p:** probabilidad

Como se puede observar en el gráfico (figura 16), se obtuvo la mayor cantidad en gramos de la fracción de hidrocarburos aromáticos (F.H.A) en una condición de 8 horas sin agitación, lo cual, se correlaciona con lo obtenido en la tabla 10. Los resultados indican que la agitación, no es un factor que afecta significativamente la variabilidad de los gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos extraída ( $p=0,374$ ), es decir, que la agitación no es una variable influyente en el proceso de retención de los poliaromáticos en la membrana semipermeable. Por otro lado, el tiempo y la interacción agitación-tiempo sí presentan diferencias significativas, con valores de  $p=0,020$  y  $p=0,031$  respectivamente, lo que quiere decir que, el tiempo sí parece ser una variable determinante en el proceso de absorción de los compuestos en la membrana, al igual que la interacción entre los dos factores estudiados. Los valores de probabilidad que se muestran en la tabla 11 sólo indican si el tiempo y la agitación, como factores, presentan diferencias significativas, pero para determinar específicamente la condición que genera esta diferencia, se realizó una prueba a posteriori conocida como diferencia

mínima significativa de Fisher, con la finalidad de comparar cada uno de los tratamientos e indicar en cuál de ellos presenta la diferencia significativa <sup>[51]</sup>. En la tabla 12 se pueden observar los valores obtenidos de esta prueba, la cual indica que la condición de 8 horas sin agitación es la que presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al resto de los tratamientos del diseño experimental.

**Tabla 12.** Prueba a posteriori de diferencia mínima significativa de Fisher aplicada a los resultados del análisis de varianza <sup>[49]</sup>.

Tratamiento	Agitación	Tiempo (horas)	p {2}	p {3}	p {4}
{1}	S.A	8	0,036	0,005	0,027
{2}	C.A	8		0,205	0,847
{3}	S.A	48			0,271
{4}	C.A	48			

S.A Sin agitación      C.A Con agitación      p: probabilidad

Si  $p < 0,05$  Hay diferencia significativa entre las medias.

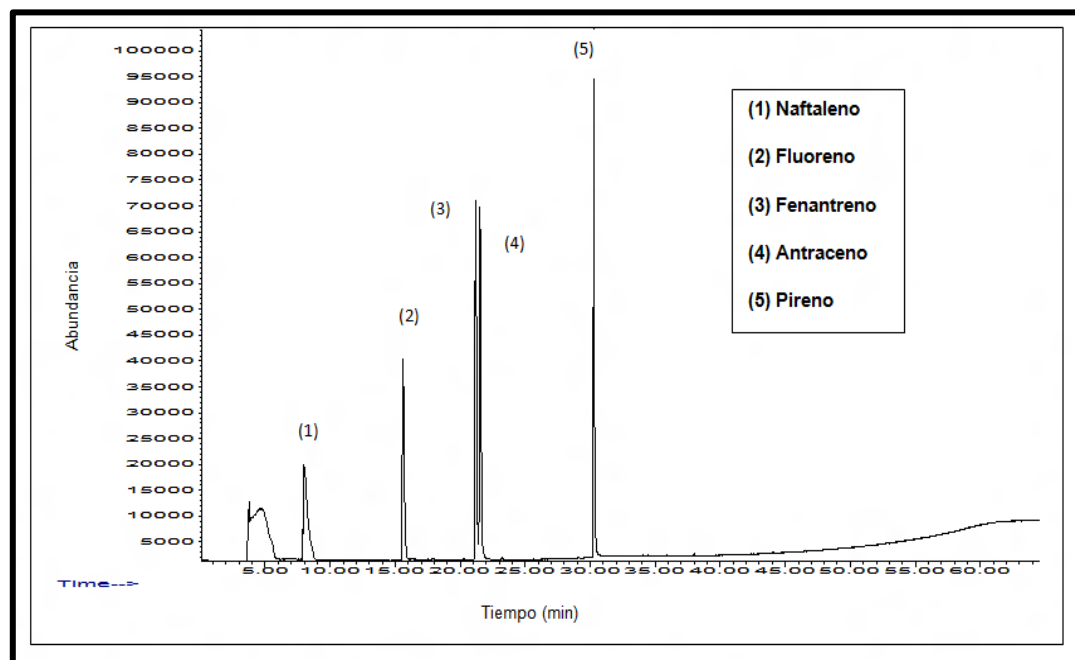
Si  $p > 0,05$  No hay diferencia significativa, las medias son iguales estadísticamente.

#### **5.4 ANÁLISIS DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA DE MUESTREO EMPLEADA**

Para evaluar la reproducibilidad de la técnica de muestreo empleada en esta investigación, fueron determinados los siguientes parámetros estadísticos: media, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV), a los datos obtenidos del diseño experimental, con la finalidad de estudiar el grado de concordancia de los resultados. Estos valores se presentan en la tabla 10, donde se puede observar que, la precisión difiere entre los datos obtenidos para las condiciones con y sin agitación, esto puede ser corroborado con los valores del porcentaje del coeficiente de variación, el cual, es mayor para los ensayos sin agitación, lo que quiere decir, que hay una mayor dispersión en los ensayos realizados sin agitación. Así mismo, es posible indicar que hay una mayor reproducibilidad cuando se emplea agitación, por lo que se infiere que, agitar favorece la condición de equilibrio en el sistema.

#### **5.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS HAP PRESENTES EN LAS FRACCIONES DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS**

En la figura 17 se muestra un cromatograma característico del orden de elución de los cinco compuestos evaluados, correspondiente a un patrón de 0,2975 mg/L de cada uno de los HAP estudiados, preparado en acetonitrilo a partir de los compuestos puros certificados. Así mismo, en la tabla 13 se muestra el tiempo de retención asociado a cada pico cromatográfico. Con esta información, fueron identificados los picos en cada una de las muestras correspondientes al diseño experimental, determinando así cualitativamente los hidrocarburos poliaromáticos presentes en las mismas.



**Figura 17.** Orden de elución de los analitos en estudio. Patrón de 0,2975 mg/L preparado en acetonitrilo a partir de una mezcla con los compuestos puros.

**Tabla 13.** Tiempos de retención de los HAP en estudio.

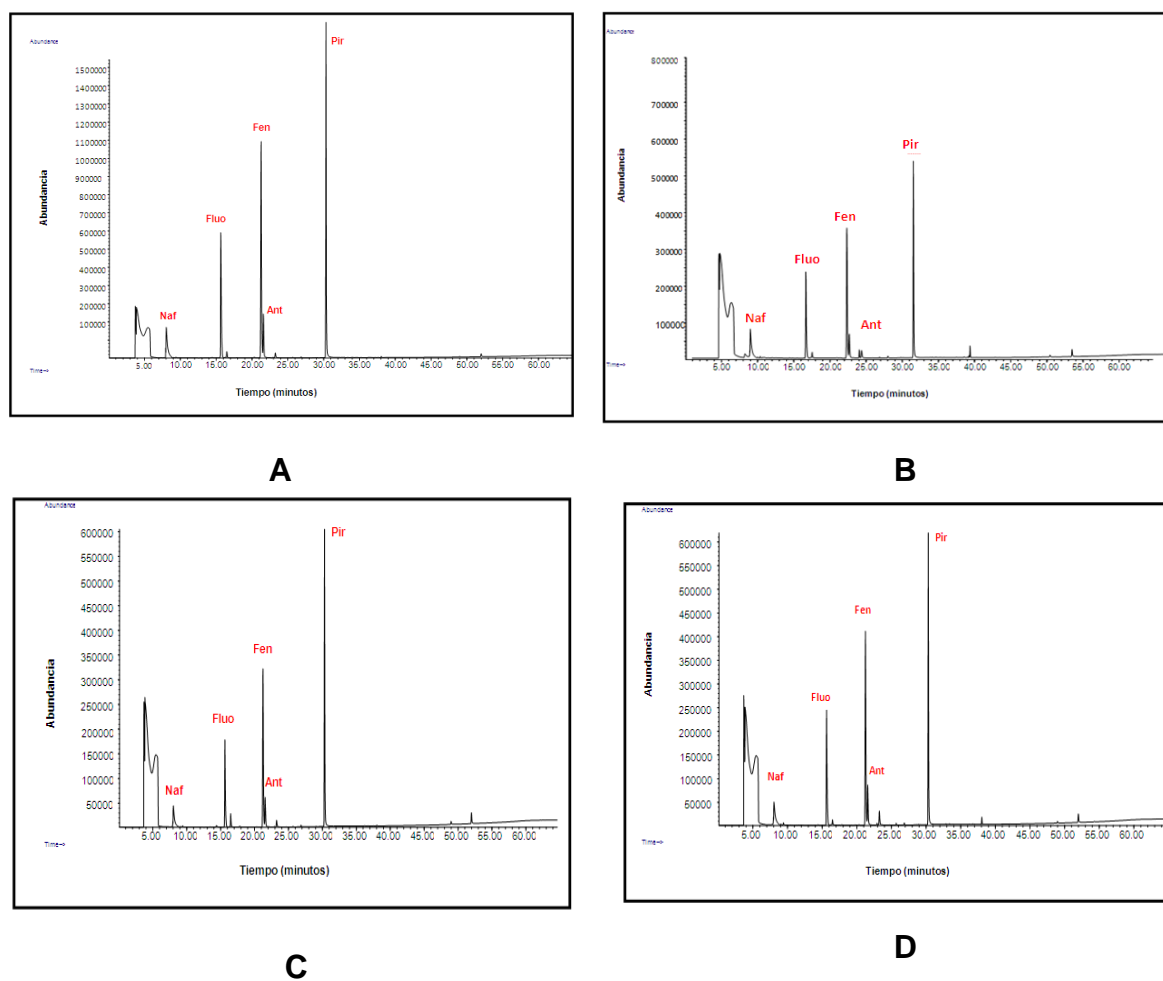
Compuesto	Tiempo de Retención (minutos)
Naftaleno(1)	8,026
Fluoreno(2)	15,528
Fenantreno(3)	21,206
Antraceno(4)	21,528
Pireno(5)	30,277

Cabe destacar que, al obtener el cromatograma correspondiente al blanco, el cual fue obtenido mediante un monitoreo de los iones totales (SCAN, por sus siglas en inglés), se observó la presencia de varios picos dentro del intervalo de tiempo de trabajo y aunque son picos de baja intensidad, dos de ellos fueron identificados consultando la librería del detector de masas. Entre los compuestos detectados, se encontró que uno de los picos corresponde a uno de los HAP estudiados, el pireno, con un tiempo de retención de 29,881 minutos, y el otro compuesto se identificó como benzofenona, con un tiempo de retención de 16,362 minutos. En comparación con el patrón, los tiempos de retención no coinciden, sin embargo, al momento de realizar los análisis el equipo presentó fallas técnicas, a lo que se debe el no obtener tiempos de retención que fueran reproducibles, sin embargo, los fragmentogramas elucidados por la biblioteca coinciden muy bien con estos compuestos (ver apéndice 9.4).

La presencia de pireno en la muestra del blanco se puede atribuir a una contaminación en el equipo o posiblemente sea un compuesto que se encuentre presente en el aceite de soya empleado como fase secuestrante, ya que, éste se obtiene del procesamiento de las semillas de soya que provienen de sembradíos ubicados en zonas a cielo abierto que pudieran estar expuestas a la contaminación por este compuesto <sup>[10]</sup>, sin embargo, esto se hubiese podido verificar haciendo un análisis por cromatografía de gases a una muestra del aceite, pero por inconvenientes técnicos con el equipo no fue posible hacerlo en este trabajo. Cabe destacar que, estudios recientes han detectado la presencia de naftaleno, fluoreno, antraceno y pireno en muestras de cereales (trigo y maíz) extraídas por microextracción en fase sólida (MEFS) <sup>[17]</sup>.

Por otro lado, en las fracciones de hidrocarburos aromáticos analizadas correspondientes a cada una de las condiciones establecidas para el diseño experimental, fueron detectados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría

de masas los cinco hidrocarburos poliaromáticos estudiados, por lo que, fue posible realizar una comparación en la abundancia de los HAP presentes en las muestras con los resultados obtenidos del tratamiento estadístico, estableciendo así la condición óptima de muestreo para la exposición del DMS en campo. Los tiempos de retención asociados a cada pico de los cromatogramas se muestran en el apéndice 9.5. Así mismo, en la figura 18 se muestran los cromatogramas correspondientes a cada condición establecida en el diseño experimental.



**Figura 18.** Cromatogramas correspondientes a las condiciones del diseño experimental: (A) 8 horas sin agitación; (B) 8 horas con agitación; (C) 48 horas sin agitación; (D) 48 horas con agitación.

En cada uno de los cromatogramas presentados en la figura 18 se pueden identificar los cinco HAP que fueron objetos de estudio observándose que la abundancia de estos compuestos en el cromatograma correspondiente a 8 horas sin agitación (figura 18A), varía considerablemente con respecto a las otras condiciones. En la tabla 14 se presentan los valores estimados de la abundancia para cada compuesto en los cromatogramas de cada condición, cabe destacar que, se consideró sólo una muestra, sin las réplicas, como ejemplo. Se observa además que, exceptuando el pireno los valores indican una mayor abundancia en todos los compuestos para la condición de 8 horas sin agitación, siendo esta condición considerada como la óptima para la técnica de muestreo planteada en este trabajo de investigación, además es importante mencionar que a 48 horas con o sin agitación no se observan cambios significativos en la abundancia de manera general, lo que permite indicar que estos resultados se corresponden con lo obtenido en el tratamiento estadístico.

**Tabla 14.** Valores estimados de la abundancia de los picos cromatográficos para cada condición del diseño experimental.

Compuesto	Abundancia para cada condición			
	8h/S.A	8h/C.A	48h/S.A	48h/C.A
Naftaleno	140.000	90.000	40.000	50.000
Fluoreno	600.000	250.000	180.000	250.000
Fenantreno	1.060.000	380.000	320.000	410.000
Antraceno	200.000	70.000	50.000	90.000
Pireno	>1.600.000	>550.000	>600.000	>600.000

S.A: Sin Agitación

C.A: Con Agitación

## 5.6 ANÁLISIS DE LA EXPOSICIÓN DEL DMS A LA CONDICIÓN ÓPTIMA DE MUESTREO

Una vez establecida la condición óptima de muestreo que fue de 8 horas sin agitación, condición en la que se obtuvo la mayor cantidad en gramos de fracción de hidrocarburos aromáticos (F.H.A) de acuerdo al diseño experimental, se expuso el DMS construido, con dos membranas semipermeables en un mismo soporte, en consecuencia, la cantidad en mL fue de  $2,05 \pm 0,01$  a estas condiciones, en 15 L de una solución de menor concentración (0,5 mg/L) para evaluar cuánto era posible extraer de la F.H.A, de manera de simular aún más las condiciones de campo. A pesar de colocar dos membranas, una vez retiradas de la solución fueron tratadas como una sola, ya que, la finalidad de esto fue obtener una mayor cantidad de los poliaromáticos. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15.** Gramos de la fracción de hidrocarburos aromáticos y porcentaje de recuperación obtenidos de la exposición del DMS.

<b>Muestra</b>	<b>gramos F.H.A extraída / mL aceite (g/mL)</b>	<b>Porcentaje de recuperación de HA (%)</b>
M <sub>DMS</sub>	$0,018 \pm 0,001$	98,7

F.H.A: Fracción de Hidrocarburos Aromáticos

H.A: Hidrocarburos Aromáticos

Si se compara este resultado con el del diseño experimental bajo la misma condición (ver tabla 10), queda en evidencia que, colocar dos membranas efectivamente proporciona una mayor cantidad de fracción de hidrocarburos aromáticos. Adicionalmente, el porcentaje de recuperación para este ensayo fue calculado a partir de los gramos de HAP totales en solución por 2 mL de aceite, este resultado indica que se extrae prácticamente la totalidad de lo que se colocó inicialmente (ver apéndice 9.6). Por otro lado, este experimento se realizó sin réplica debido a la gran cantidad de desecho que se hubiese generado proveniente de las aguas contaminadas, ya que, para este ensayo se prepararon 15 L de solución, y a pesar de que los HAP se encontraban a una baja concentración de 0,5 mg/L, lo que se quería era exponer el DMS elaborado a una cantidad de agua considerable y evaluar su eficiencia. Por otro lado, el análisis cromatográfico de esta muestra no se llevó a cabo debido a que se presentaron problemas técnicos con el equipo, lo cual, no permitió, dentro del tiempo estimado para el desarrollo de esta investigación, obtener el cromatograma característico que permitiera visualizar la presencia o ausencia de los HAP en la muestra. Sin embargo, asumiendo que toda la F.H.A obtenida corresponde sólo a los hidrocarburos poliaromáticos, se puede inferir que estos compuestos podrían ser efectivamente identificados mediante un análisis por CG-EM, ya que, la cantidad en gramos de fracción aromática es mayor, por lo tanto, la abundancia de la señal se esperaría que también sea mayor. Por último, se debe mencionar que el error reportado en la tabla 15 está expresado en función de la propagación de errores analíticos, ya que no se hicieron réplicas de este experimento.

En síntesis, los resultados obtenidos permiten inferir la posibilidad de empleo de este dispositivo en aguas de ríos donde los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentren a bajas concentraciones, resaltando la ventaja de este equipo de muestreo en términos de su bajo costo y facilidad de producción para su implementación en estudios de interés ambiental.

## 6. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos, se plantean las siguientes conclusiones:

- El diseño experimental y el análisis de varianza con dos factores para el muestreo de agua determinó que la condición óptima de muestreo en el laboratorio corresponde a un tiempo de 8 horas sin agitación, evidenciada por un porcentaje de recuperación del 80%.
- Los HAP estudiados pueden ser determinados en campo bajo la condición optimizada en aguas naturales donde se asuma la presencia de cierto grado de contaminación y que además, contenga estos compuestos en concentraciones cercanas a 5 mg/L como mínimo.
- La membrana semipermeable empleada confeccionada con bolsas con cierre tipo clic de un material de polietileno de baja densidad, sin la fase secuestrante tienen la capacidad de adsorber estos compuestos en el tiempo de 8 horas y aumentar la sensibilidad de muestreo, ya que, pueden absorber un porcentaje de recuperación del 4%.
- El dispositivo de membrana semipermeable (DMS) construido con materiales nacionales resultó ser una herramienta útil en la detección de HAP en una muestra de agua preparada en el laboratorio, por lo que, se infiere, puede ser implementada en campo, como una técnica de bajo costo y una alternativa de muestreo en comparación con los métodos existentes, expuestos en el fundamento teórico.

## 7. RECOMENDACIONES

A continuación se exponen una serie de recomendaciones que permitirán complementar el estudio de la técnica de DMS y realizar investigaciones futuras en este tema:

- Complementar este estudio realizando el análisis por CG-EM de las muestras obtenidas de la exposición del DMS confeccionado, a fin de evaluar la determinación de los HAP a concentraciones más bajas de las estudiadas en este trabajo de investigación.
  
- Utilizar otros aceites naturales como aceite de girasol y de oliva, con la finalidad de comparar la afinidad lipofílica que presentan los HAP con diferentes fases secuestrantes.
  
- Ampliar el estudio tomando en cuenta el resto de los poliaromáticos de bajo y mediano peso molecular que son considerados como prioritarios por la EPA, a fin de evaluar su comportamiento empleando DMS para su determinación.
  
- Realizar la extracción y análisis por CG-EM del aceite empleado como fase secuestrante, de manera que se puedan identificar todos compuestos presentes.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lebo J., Zajicek J., Huckins J., Petty J. y Peterman P. (1992). Use of Semipermeable membrane devices for in situ monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in aquatic environments. *Chemosphere*, 25 (5), 697-718.
- [2] Södergren A. (1990). Monitoring persistent. Lipophilic pollutants in water and sediments by solvent-filled. Dialysis membranes. *Ecotoxicologic and Environmental Safety*. 19, 143-149.
- [3] Angulo B., (2000). Optimización de la técnica de dispositivos de membranas semipermeables (DMS) para la detección de contaminantes orgánicos en medio acuático. Directores: Anibal Rojas y Reinaldo Compagnone. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela.
- [4] Huckins J., Manweera G., Petty J., Macka Y. y Lebo J. (1993). Lipid-containing Semipermeable membrane device for monitoring organic contaminants in water. *Environmental Science and Technology*, 27 (12), 2489-2496.
- [5] Universidad de Concepción Centro EULA-Chile. (2007). Programa de monitoreo ecotoxicológico de los efluentes industriales en el río Cruces, Provincia de Valdivia, Chile. Capítulo 5: Contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y membranas semipermeables. [Documento en línea]. Disponible en: [http://www.sinia.cl/1292/articles-35166\\_Cap5.pdf](http://www.sinia.cl/1292/articles-35166_Cap5.pdf) [Consulta: 12 de mayo de 2012]
- [6] Vargas M., Romero G., Palencia A., Rivero E. y Piñero S. (2013). Equivalentes tóxicos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en particulado atmosférico en

Valencia, Venezuela. Universidad de Carabobo. Estado Carabobo, Venezuela. *Acta Toxicológica Argentina* 21(2): 69-77.

[7] Fernández R., Gómez H., Galarraga F., Hernández J., Roschman A. y Escalona A. (2013). Biomonitorio activo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire del valle de Caracas-Venezuela, empleando el liquen *Parmotrema sancti-angelii* (LYNGE) Hale. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (4): 261-267.

[8] Guerra J. (2013). Estudio de los hidrocarburos aromáticos policíclicos asociados a los sedimentos de fondo de la Cuenca del Río Tuy, Venezuela. Director: Carlos Barrios. Tesis de pregrado. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

[9] Benítez P. Y Miranda L. (2013). Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de Latinoamérica. *Revista Internacional de Contaminación ambiental*, 29, 7-23.

[10] Agudo A. (2010). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Instituto Catalán de Oncología. Madrid-España. [Libro en línea]. Disponible en: <http://www.ugt.es/saludlaboral/hidrocarburos.pdf>[Consulta: 10 de mayo del 2012]

[11] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1995). Resumen de salud pública. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf> [Consulta: 12 de Mayo de 2014].

[12] Morales R. (2011). Remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos por consorcios microbianos autóctonos en el suelo, en la playa "Puerta La Barra", Municipio Carirubana, estado Falcón. Tesis de pregrado no publicada. Universidad Experimental "Francisco de Miranda", Falcón, Venezuela.

[13] Holland H. y Turekian K. (2003). *Treatise of Geochemistry* Elsevier. 5155 p.

[14] Ortíz R., Cram S. y Sommer I. (2012). Hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos de la llanura aluvial baja del Estado de Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 28: 131-144.

[15] Lehndorff E. y Schwark L. (2004). Biomonitoring of air quality in the Cologne Conurbation using pine needles as a passive sampler Part II: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Atmospheric Environment*. 38: 3703-3808.

[16] Hergueta, V. (2013). Identificación y cuantificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de aire de ambientes de trabajo por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

[17] Mujica R. (2010). Estudio de la micro extracción en fase solida de los HAPs en muestras de cereales y su análisis por cromatografía de gases. Directores: Dra. Rosa Amaro y Dr. Andrés Escalona. Centro de Química Analítica. Tesis de pregrado. Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

[18] Chirino Y., Benzo Z., Fernández R., Galarraga F., Roschman A., Gómez H., Salas J. y Escalona A. (2013). Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en partículas atmosféricas sedimentadas en un área de la ciudad de Caracas, Venezuela. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

- [19] Santana J., Valdés M., Olivares S. y Lima L. (2012). Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos ligeros en aguas superficiales de los ríos Almendares y Luyanó en La Habana. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 43, 1-7.
- [20] Vrana B., Mills G., Ian A., Dominiak E., Svensson K., Knutsson J., Morrison G. y Greenwood R. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 24, N°10.1-24.
- [21] Huckins J., Petty J., Booig J. (2006). Monitors of Organic Chemicals in the Environment Semipermeable Membrane Devices. *Springer Science + Business Media, LLC*. pg 223.
- [22] Mohrig J., Hanmond C. y Schatz P. (2010). *Techniques in Organic Chemistry*. Third Edition, W. H. Freeman and Company.
- [23] Fernández A., Yarto M. y Castro J. (2005). Las sustancias tóxicas persistentes. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología (INE). Página 173-187.
- [24] Environmental Sampling Technologies. Product: Semipermeable Membrane Device (SPMD) and its Deployment. [Página en línea]. Disponible en: [www.est-lab.com/spmd.php](http://www.est-lab.com/spmd.php) [Consulta: 12 de Mayo de 2014]
- [25] V. Camel, (2000). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Trends Anal. Chem.*; 19: 229.

- [26] Bustamante J., Navarro P., Arana G., de Diego D. y Madariaga J. (2013). Ultrasound assisted dialysis of Semipermeable membrane devices for the simultaneous analysis of a wide number of persistent organics pollutants. *Talanta*, 114, 32-37
- [27] Ma Mei., Wang C., Wang Z. (2005) Assessing Toxicities of Hydrophobic Organic Pollutants in Huaihe River by Using Two Types of Sampling. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40, 331-342.
- [28] BartkowM., HawkerD., Kennedy K. y Muller J. (2004).Characterizing Uptake Kinetics of PAHs from the Air Using Polyethylene-Based Passive Air Samplers of Multiple Surface Area-to-Volume Ratios. *Environmental Science & Technology*, 38 (9), 2701-2706.
- [29] Strandberg B., Bergqvist P. y Rappe C. (1998). Dialysis with Semipermeable membranes as an efficient lipid removal method in the analysis of bioaccumulative chemicals. *Analytical Chemistry*, 70(3), 526-533.
- [30] Azuola R. y Vargas P. (2007). Extracción asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, Vol 20-4.
- [31] Morales M.F. (2011). Determinación de hidrocarburos en muestras de agua por extracción líquido-líquido asistida por ultrasonido. Tesis de maestría. Universidad de Alicante. Centro Tecnológico de Alicante.
- [32] Suslick K. (1998) Ultrasound. Its Chemical, physical and biological effects. *VCH Publishes, Inc: New York-USA*.

- [33] Vera L., Cázares E., Covarrubias R. y Camacho E. (2002). Metodología en línea para la determinación de HAP en agua al nivel de ultra trazas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 18(1), 5-16.
- [34] Peña A., Morales J., Labastida C. y Capella S. (2003) Extracción en fase sólida como una alternativa para el proceso de limpieza en la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por Cromatografía de Gases: Aplicación a organismos marinos. *Revista Internacional Ambiental*. 19(1) 13-23.
- [35] Díaz M.A., Torres T., Ortiz J., Reyes J., Martín J. y Canoira L. (2007). Determinación de compuestos orgánicos para el estudio de suelos contaminados: diseño de procedimientos analíticos para su adecuación a la nueva legislación española (R.D. 9/2005). *Boletín Geológico y Minero*, 118(1): 91-104.
- [36] Díaz N., Alfaro J. y Garza H. (2001) Método analítico para detectar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL*. Vol IV. N°4. 420-425.
- [37] Vicéns J., Herrarte A., Medina E. (2005). Análisis de Varianza (ANOVA). Universidad Autónoma de Madrid. ISSN 1697-5731, Vol.26, N° 1. 285-286
- [38] Miller J. N. y Miller J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta Edición. *Prentice Hall*. Pg. 286.
- [39] Chacín F. (2000). Diseño de experimentos. Ediciones del Vicerrectorado Académico de la Universidad Central de Venezuela. Caracas
- [40] Karacik B. Lance E., Matz A., Reeves M. y Verbrugge L. (2012). Petroleum Hydrocarbon contamination in Nelson, Alaska, sampling three different matrices. *Marine Pollution Bulletin* 64, 2129-2134.

[41] Vrana B., Klu V., Beniká E., Aboud-Mrad N., Amdany R., Haráková S., Draxler A., Humer F. y Gans O. (2014). Passive sampling: An effective method for monitoring seasonal and spatial variability of dissolved hydrophobic organic contaminants and metals in the Danube River. *Environmental Pollution*. 184. 101-112.

[42] Method 3630C. *Environmental Protection Agency (EPA-USA)*. Silica Gel Cleanup [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3630c.pdf> [Consulta: 20 de mayo de 2014].

[43] Ibedaca J. (2014). Optimización de las metodologías de extracción asistida por microondas y ultrasonido para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de *Tilandsia Recurvata (L.)* L Biomonitor de la contaminación atmosférica. Tesis de pregrado. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

[44] King A.J., Readman J., Zhou J. (2004). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction gas chromatography – mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 523. 259-267.

[45] Polímero del metil metacrilato (PMMA). [Documento en línea]. Disponible en [www.acrilico-y-policarbonato.com/acrilico-propiedades.html](http://www.acrilico-y-policarbonato.com/acrilico-propiedades.html) [Consulta: 9 de septiembre de 2015]

[46] Tereftalato de polietileno. [Documento en línea]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Tereftalato\\_de\\_polietileno](http://es.wikipedia.org/wiki/Tereftalato_de_polietileno) [Consulta: 9 de septiembre de 2015]

[47] Tecnología de punta en la producción de aceites y grasas. Composición de ácidos grasos. [Documento en línea]. Disponible en: [www.chempro.in/fattyacid.htm](http://www.chempro.in/fattyacid.htm) [Consulta: 23 de Marzo de 2015]

[48] Vrana B., Paschke A., Popp P. y Schüürmann G. (2001). Use of Semipermeable Membrane Devices (SPMDs). *Environmental Science & Pollutant*. Res 8 (1) 27-34.

[49] Statistica versión 10.0. [Programa de computadora] Disponible en: <http://statistica.software.informer.com/10.0/> [Consulta: 25 de Junio de 2015].

[50] Sorribas A. (2014). Introducción al Análisis de Varianza (ANOVA). Ciencias Básicas Médicas. Universidad de Lleida. [Documento en línea]. Disponible en: [web.udl.es/Biomath/Bioestadistica/Curs/Classes\\_2014/Tema%2013.%20ANOVA/anova.pdf](http://web.udl.es/Biomath/Bioestadistica/Curs/Classes_2014/Tema%2013.%20ANOVA/anova.pdf) [Consulta: 15 de Septiembre de 2015].

[51] Fallas J. (2012). Análisis de Varianza. Comparando tres o más medias. [Documento en línea]. Disponible en: [http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis\\_de\\_varianza\\_2012.pdf](http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf) [Consulta: 28 de Septiembre de 2015]

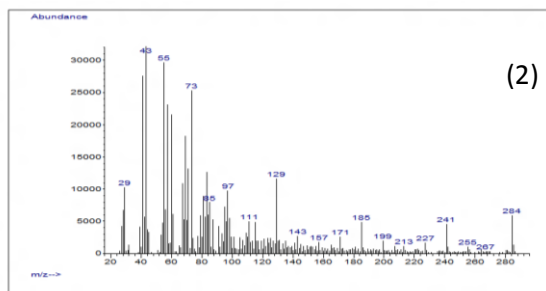
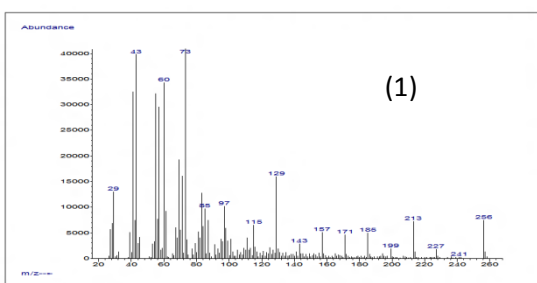
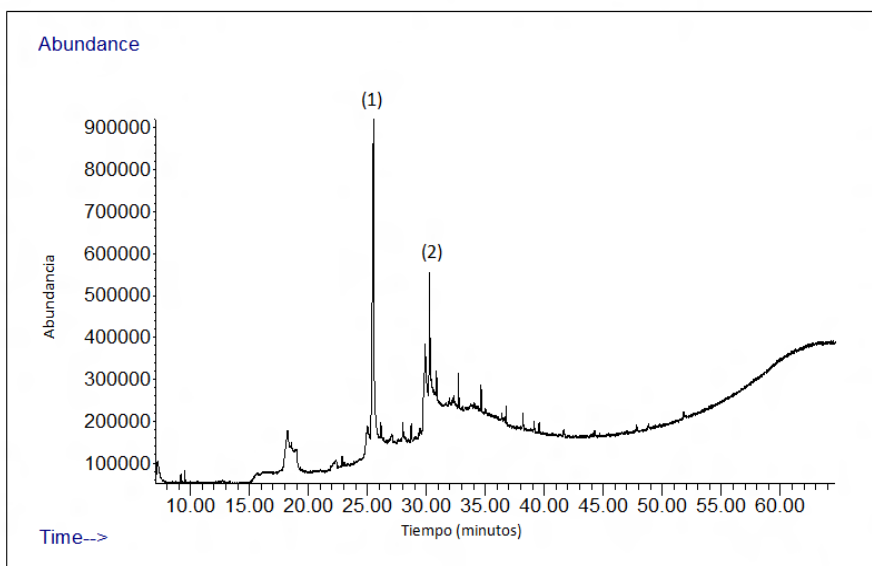
[52] Agilent Technologies. Guía de Selección de Columnas Agilent J&W para GC 5989-6159ES. Agilent Technologies Inc. 2007.

## 9. APÉNDICE

### 9.1 Concentraciones de naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno en las soluciones de hexano, metanol y agua.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración en solución madre de hexano (mg/L)</b>	<b>Concentración en hexano (dilución 1) (mg/L)</b>	<b>Concentración en metanol (dilución 2) (mg/L)</b>	<b>Concentración en agua (dilución 3) (mg/L)</b>
Naftaleno	6557	983,5	196,7	4,92
Fluoreno	6539	980,9	196,2	4,91
Fenantreno	6584	987,6	197,5	4,94
Antraceno	6513	976,9	195,4	4,90
Pireno	6507	976,1	195,2	4,91

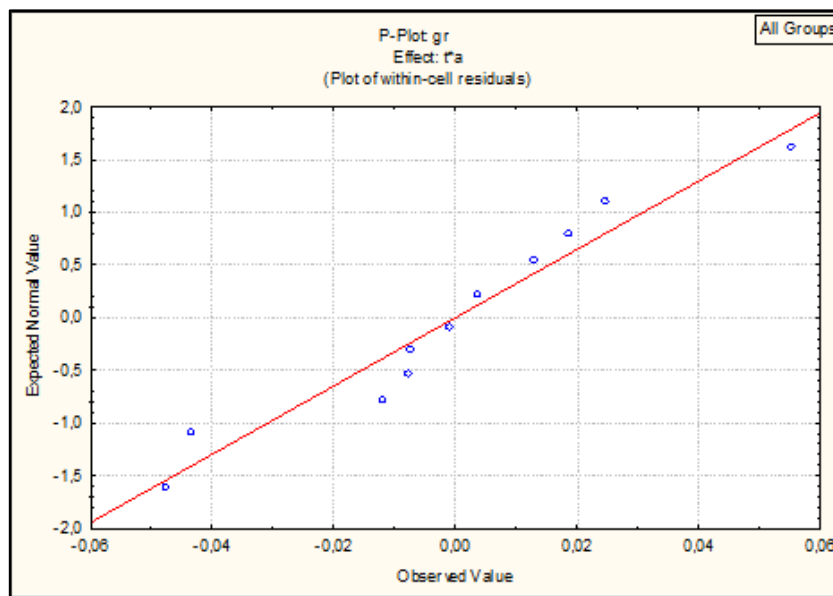
**9.2 Cromatograma correspondiente a la fracción de hidrocarburos aromáticos obtenida de la cromatografía en columna con pipeta Pasteur donde se observa la saturación por la presencia de ácidos grasos provenientes del aceite de soya según los espectros de masas.**



Los espectros de masas (1) y (2) son característicos de compuestos saturados.

**9.3 Pruebas a priori realizadas para el empleo del tratamiento estadístico de los datos por ANOVA. Gráfico de normalidad y valores estadísticos de la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas.**

Gráfico de Normalidad

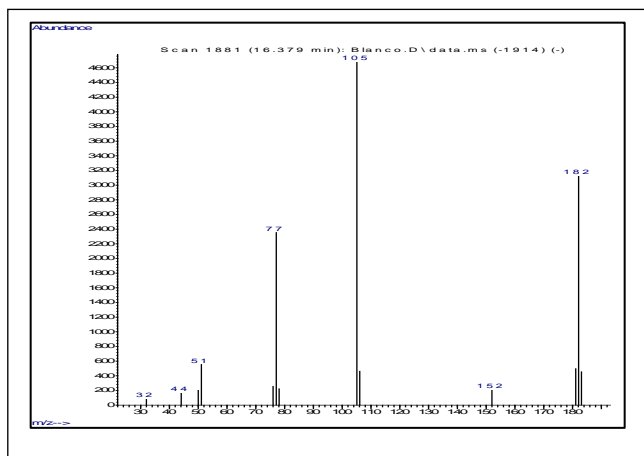
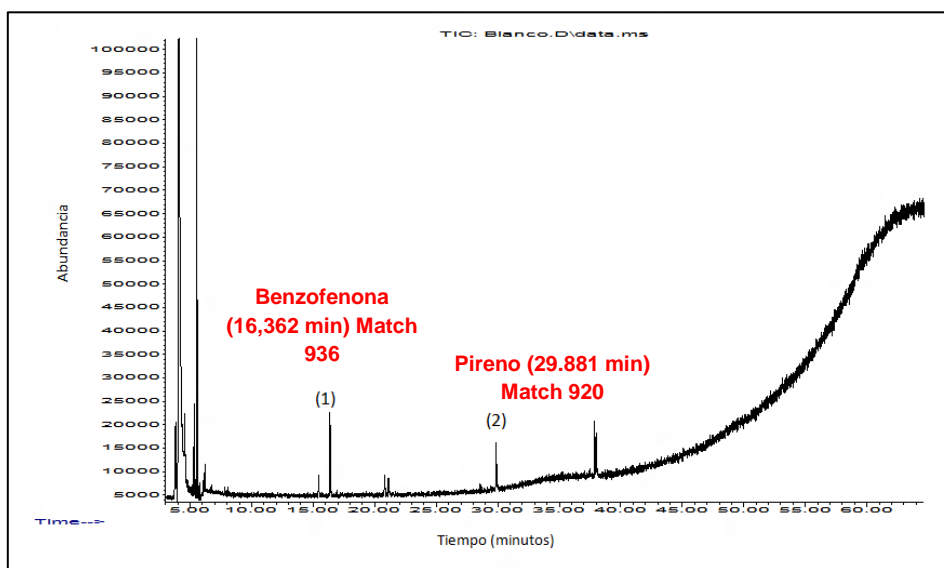


Estadístico de Levene de igualdad de varianzas

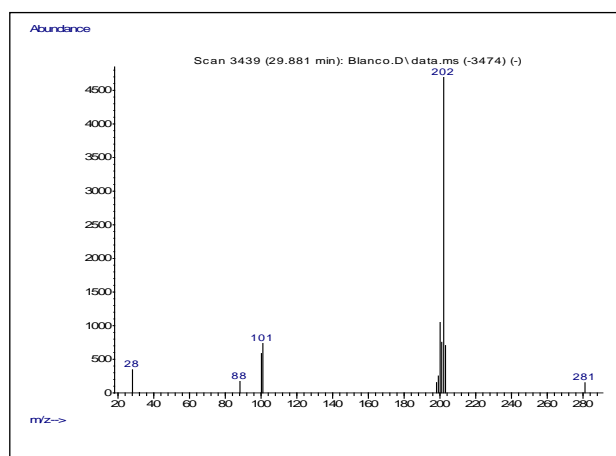
Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p
0,000721	0,000217	3,316720	0,077765

$p > 0,05$  se comprueba que las varianzas son iguales.

## 9.4 Cromatograma de un blanco y espectros de masas asociados a los picos señalados.



Espectro de masa del pico (1)



Espectro de masa del pico (2)

**9.5 Tiempos de retención de los HAP presentes en los cromatogramas de las muestras del diseño experimental a las diferentes condiciones.**

<b>8 horas sin agitación</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Tr (minutos)</b>
	Naftaleno	8,066
	Fluoreno	15,662
	Fenantreno	21,283
	Antraceno	21,598
	Pireno	30,355

<b>8 horas con agitación</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Tr (minutos)</b>
	Naftaleno	8,151
	Fluoreno	15,669
	Fenantreno	21,199
	Antraceno	21,553
	Pireno	30,242

<b>48 horas sin agitación</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Tr (minutos)</b>
	Naftaleno	8,046
	Fluoreno	15,639
	Fenantreno	21,243
	Antraceno	21,575
	Pireno	30,321

<b>48 horas con agitación</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Tr (minutos)</b>
	Naftaleno	8,050
	Fluoreno	15,642
	Fenantreno	21,250
	Antraceno	21,578
	Pireno	30,322

**9.6 Gramos de fracción aromática, volumen de aceite agregado a cada membrana, gramos iniciales en solución y porcentaje de HCA**

<b>Muestra</b>	<b>Condición</b>	<b>Volumen de aceite (<math>\pm 0,01</math> mL)</b>	<b>Gramos F.H.A extraída/mL aceite (g/mL)</b>	<b>Gramos HAP totales iniciales en solución/mL de aceite</b>	<b>% de recuperación</b>
1	8 h/S.A	1,09	0,017 $\pm$ 0,002	0,0231 $\pm$ 0,0006	73,6
4		1,11	0,014 $\pm$ 0,002	0,0226 $\pm$ 0,0006	61,9
9		1,09	0,018 $\pm$ 0,002	0,0224 $\pm$ 0,0006	80,4
2	8h/C.A	1,10	0,0137 $\pm$ 0,0005	0,023 $\pm$ 0,001	59,6
3		1,17	0,0146 $\pm$ 0,0005	0,021 $\pm$ 0,001	69,8
12		1,22	0,0144 $\pm$ 0,0005	0,020 $\pm$ 0,001	69,5
5	48h/S.A	1,02	0,012 $\pm$ 0,002	0,024 $\pm$ 0,002	50,0
7		1,09	0,011 $\pm$ 0,002	0,022 $\pm$ 0,002	50,0
11		1,01	0,014 $\pm$ 0,002	0,024 $\pm$ 0,002	58,3
10	48h/C.A	1,12	0,015 $\pm$ 0,001	0,022 $\pm$ 0,002	68,2
6		1,13	0,013 $\pm$ 0,001	0,023 $\pm$ 0,002	56,5
8		1,22	0,012 $\pm$ 0,001	0,019 $\pm$ 0,002	63,2
Blanco	48h/C.A	1,31	0,0012 $\pm$ 0,0001		
Membrana sin aceite	8 h/S.A	0	0,0009 $\pm$ 0,0002	0,0375 $\pm$ 0,002 *	3,7

HCA: Hidrocarburos Aromáticos

F.H.A: Fracción de Hidrocarburos Aromáticos

\* gramos de HAP totales iniciales en solución / 2 mL de aceite

### 9.7 Fotografía del cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas empelado para el análisis de HAP.



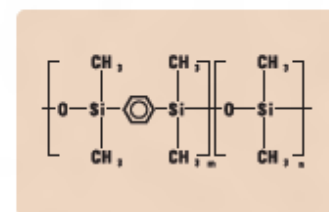
<b>Marca</b>	Agilent Technologies Inc.
<b>Modelo</b>	6890N
<b>Detector de Masas</b>	5975 – MS
<b>Automuestreador</b>	7683B Series
<b>Software</b>	ChemStation Agilent
<b>Performance</b>	Tiempo de retención y Repetibilidad <0,008 % o <0,008 min Área de Repetibilidad < 1 % RSD
<b>Altura</b>	50cm (19,7 pulgadas)
<b>Ancho</b>	58cm (22,8 pulgadas) con EPC inlets y detectores
<b>Profundidad</b>	54 cm (21,6 pulgadas)
<b>Peso</b>	49 Kg (108 libras)
<b>Programación</b>	Programador de tiempo 4 conexiones internas 24 V ( 150mA) 2 conexiones externas 24 V (75mA)

## 9.8 Especificaciones de la columna [52].

### DB-5ms

- Polímero fenil arileno prácticamente equivalente a (5%-fenil)-metilpolisiloxano
- No polar
- Características de muy bajo sangrado, ideal para GC/MS
- Excelente comportamiento inerte frente a compuestos activos
- Mejor relación señal/ruido para una mayor sensibilidad e integridad de los espectros de masas
- Ligadas y entrecruzadas
- Lavable con disolvente
- Test MSD y certificación disponible
- Sustituto exacto de HP-5TA
- Prácticamente equivalente a la fase USP G27
- Mezcla de test disponible

**Fases similares:** Rtx-5ms, PTE-5, CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS, BPX-5, AT-5ms, ZB-5ms



Estructura de poli(dimetilsilox)poli  
(1,4-bis(dimetilsilox)fenil)siloxano

#### DB-5ms

ID(mm)	Longitud (m)	Película (µm)	Límites temp. (°C)	Referencia
0,18	20	0,18	-80 a 325/350	121-5522
0,18	40	0,18	-80 a 325/350	121-5542
0,20	12	0,33	-80 a 325/350	128-5512
0,20	25	0,33	-80 a 325/350	128-5522
0,20	50	0,33	-80 a 325/350	128-5552
0,25	15	0,10	-80 a 325/350	122-5511
0,25	15	0,25	-80 a 325/350	122-5512
0,25	15	0,50	-80 a 325/350	122-5516
0,25	15	1,00	-80 a 325/350	122-5513
0,25	25	0,25	-80 a 325/350	122-5522
0,25	25	0,40	-80 a 325/350	122-552A
0,25	30	0,10	-80 a 325/350	122-5531
0,25	30	0,25	-80 a 325/350	122-5532
0,25	30	0,50	-80 a 325/350	122-5536
0,25	30	1,00	-80 a 325/350	122-5533
0,25	50	0,25	-80 a 325/350	122-5552
0,25	60	0,10	-80 a 325/350	122-5561
0,25	60	0,25	-80 a 325/350	122-5562
0,25	60	1,00	-80 a 325/350	122-5563

Modelo  
empleado en  
este trabajo de  
investigación